N° 106

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE DIJON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Robert NETTER

1RE THÈSE : Contribution à l'étude de la conservation du poliovirus par la lyophilisation

2E THÈSE : Propositions données par la Faculté

Soutenues le 29 Mars 1969 devant la Commission d'examen

MM.	BARON	*Président*
	REY	*Examinateurs*
	CAUMARTIN ..	
Mlle	SIMATOS	*Rapporteur*

N° 106

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE DIJON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Robert NETTER

1RE THÈSE : Contribution à l'étude de la conservation du poliovirus par la lyophilisation

2E THÈSE : Propositions données par la Faculté

Soutenues le 29 Mars 1969 devant la Commission d'examen

MM.	BARON	*Président*
	REY	*Examinateurs*
	CAUMARTIN ..	
Mlle	SIMATOS	*Rapporteur*

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE DE DIJON — FACULTE DES SCIENCES

Doyen R. CIRY
Assesseur TIROUFLET.

Professeurs Titulaires

M. R. CIRY
J. DECOMBE
B. d'ORGEVAL/DUBOUCHET
J. BOUCHARD
C. ARNAL
R. HUSSON
J. TIROUFLET
J. ARBAULT
P. BARRET
G. CLEMENT
C. BARON
C. NOIROT
P. HENRY

M. R. AMIOT
P. RAT
P. VERNIER
J. CHAUDONNERET
F. BUGNON
Mme WATELLE
MM. P. PIGEAUD
FOURNARI
J. MORET BAILLY
M. TINTANT
P. CACHON
L. GODEFROY
CAUMARTIN.

Maîtres de Conférences -

M.M. ROUBAUD
G. JOUBERT
A. HANEN
BEZARD
M. GUYOT

Mme G. GODEFROY
F. MORET BAILLY
P. FEUILLEE
PERSON
D. SIMATOS

Professeur honoraire : M. R. DENIS
M. F. LAGRANGE.

A mes Maîtres de l'Université

Monsieur le Professeur L. REY ex Professeur à la Faculté des Sciences de Dijon, qui m'a encouragé et témoigne sa sympathie en participant à ce Jury.

Monsieur le Professeur SOHIER, Professeur à la Faculté de Médecine de Lyon qui est un modèle de probité scientifique pour tous les virologistes.

A Monsieur le Professeur C. BARON, Président
Monsieur le Professeur CAUMARTIN, Examinateur
Mademoiselle SIMATOS , Rapporteur,

avec mes remerciements pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de faire partie de mon jury de thèse.

A ma famille,

A Monsieur le Docteur G. COULON, ancien Directeur Général du Laboratoire National de la Santé Publique, auprès de qui j'ai oeuvré dans un climat de franchise et d'amitié.

A tous mes collaborateurs et amis du laboratoire.

Ce travail a bénéficié d'une aide matérielle du Centre d'Etude cryogénique de l'Air Liquide à Sassenage (Directeur : Monsieur J. Lefèvre).

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA CONSERVATION DU POLIOVIRUS PAR LA LYOPHILISATION.

Introduction.

C'est par dessication simple et non par lyophilisation, que Pasteu réussit à atténuer le virus de la rage.

Altman, dès 1890, utilise la lyophilisation pour des travaux d'histologie (cité par 66) Freeze Drying. Le principe même de la lyophilisation est décrit en France en 1906 à l'occasion d'une communication à l'Académie des Sciences de d'Arsonval et Bordas (9).

Dans le domaine de la virologie, Shackell en 1909 (96) lyophilise du tissu nerveux infecté de virus rabique et Wurtz et Camus (113) en 1919, montrent l'intérêt du procédé pour conserver le vaccin antivariolique.

Il faut cependant, reconnaître que c'est depuis les travaux de Flosdorf et Mudd (27) que la lyophilisation a pris son essor. Cette nouvelle technique semble dès le début pleine de promesse pour tenter de conserver le pouvoir infectieux ou le pouvoir antigénique de virus réputés sensibles aux variations thermiques.

L'étude théorique de la cryosublimation ou lyophilisation (36) (87) (88) (89) est complexe car, contrairement aux bactéries, les virus sont généralement accompagnés d'une forte proportion de substances d'origine tissulaire dont il est difficile de se débarrasser, et qui sont susceptibles d'influer sur les résultats (57). A ce sujet, il nous semble important de noter qu'il existe relativement peu d'études quantitatives permettant de se rendre compte d'une manière précise de la baisse du titre infectieux du produit, sous l'effet de la congélation, de la lyophilisation, ou même au cours de la conservation du produit lyophilisé ; la plupart des auteurs anciens se contentent d'utiliser le procédé pour conserver des souches virales. La diversité même des appareils utilisés, des techniques adoptées, ou même des souches lyophilisées,rend toutes comparaisons extrêmement délicates. Il semble cependant que les résultats soient plus favorables pour le virus rabique provenant de tissu nerveux d'animal mort de rage, que pour celu qui est adapté à l'oeuf embryonné de poulet (souche Flury). Il en serai de même pour le virus de la Fièvre jaune provenant du sang, du foie de malade, ou même du cerveau de souris infectée (souche Asibi) par

opposition à celui qui est adapté à l'oeuf embryonné de poulet (Souche Rockefeller 17.D.). Le virus herpétique provenant de tissus animaux résisterait mieux à la congélation que celui qui provient de liquides allantoïques ou amniotiques d'oeuf embryonné (97). Nous-mêmes avons pu constater (observations non publiées) que le virus vaccinal cultivé sur peau de bovidé se lyophilise mieux que le virus entretenu sur cellules rénales simiennes en couche monocellulaire, et que les virus de la peste bovine et de la peste porcine adaptés au lapin, donnent des produits lyophilisés plus stables que les mêmes virus entretenus sur oeuf embryonné de poule.

Sans vouloir nier l'influence du milieu, il ne faut donc pas oublier celle de la souche virale dont l'adaptation à un nouveau milieu et l'atténuation ont pu modifier les caractères de résistances à la dessication.

Les premières expériences sur la dessication des picornavirus et plus particulièrement du poliovirus, remontent à 1909. Landsteiner et Levaditi (55) s'inspirant des travaux de Pasteur sur la rage dessèchent en présence de potasse des moelles de singes inoculés de virus poliomyélitique. A cette époque, tous les titrages devaient être faits sur singe, matériel coûteux, et l'on comprend pourquoi les auteurs restent muets sur le rendement de l'opération. Des années plus tard, Pollard (8 puis Kraft et Pollard (53) de 1951 à 1954 font de nouveaux essais sans aboutir à une stabilisation du produit. Depuis l'avènement des cultures cellulaires, les essais ont été repris avec plus ou moins de succès (31) (42).

Avant d'exposer nos propres expériences et nos résultats sur le poliovirus, il est indispensable d'effectuer une revue des virus lyophilisés pour savoir si la résistance ou la fragilité lors de la lyophilisation peut être déduite de l'analyse de la structure virale.

Influence de la structure du virus

Les virus sont constitués, soit par de l'acide ribonucléique, soit par de l'acide desoxyribonucléique entouré d'une capside protéinique.

Cette capside est nettement séparée de l'acide nucléique lorsqu'elle présente une symétrie cubique alors qu'elle forme une gaine difficileme séparable de l'acide nucléique lorsqu'elle présente une symétrie hélicoidale, La capside peut être entourée d'une enveloppe ou rester nue. Une certaine quantité de lipides fait également partie intégrante de certains virions (28). Nous donnons ci-dessous quelques exemples empruntés à Lwoff et Tournier (63), parmi les groupes de virus les mieux définis.

LES POX VIRUS

Acide desoxyribonucléique	D
Symétrie hélicoidale	H
Capside enveloppée	E
Lipides +	

Les NITA VIRUS

Acide desoxyribonucléique	D
Symétrie cubique	C
Capside enveloppée	E
I62 Capsoméres	
Lipides +	

Les PAPOVA VIRUS

Acide desoxyribonucléique	D
Symétrie cubique	C
Capside nue	N
72 Capsoméres	
Lipides -	

Les ADENOVIRUS

Acide desoxyribonucléique	D
Symétrie cubique	C
Capside nue	N
252 capsomères	
Lipides -	

Les MYXOVIRUS

Acide ribonucléique	R
Symétrie hélicoidale	H
Capside enveloppée	E
Lipides +	

Virus de la RAGE

Acide ribonucléique	R
Symétrie hélicoidale	H
Capside enveloppée	E
Lipides +	

Les PICORNAVIRUS

Acide ribonucléique	R
Symétrie cubique	C
Capside nue	N
Lipides -	

Les ARBOVIRUS

Acide ribonucléique	R
Symétrie cubique	C
Capside enveloppée (?)	E
Lipides +	

Les BACTERIOPHAGES

Acide nucléique	R ou D.
Symétrie	binaire.

LES POX VIRUS

Une brève revue de la littérature et notre expérience personnelle attestent des résultats excellents dbtenus avec le virus de la vaccine provenant de la peau scarifiée d'animal (20) (2I) (26) puisqu'après lyophilisation, ce virus est susceptible de résister à 100°C, pendant plus de 30 minutes en ne perdant que moins de 0,5 logarithme décimal.

LES NITAVIRUS

Le virus herpétique est capable de résister après lyophilisation pendant 16 heures à 100°C (35).

Le virus varicello-zonateux lyophilisé directement à partir des vésicules cutanées se conserverait pendant 70 mois (103), ce qui est particulièrement intéressant quand on connaît la fragilité du virus non lyophilisé. Les résultats sont moins bons avec le virus de culture où le virus est surtout intracellulaire au lieu d'être libre.

LES PAPOVAVIRUS ET LES ADENOVIRUS.

Nous n'avons pas retrouvé dans la littérature de résultats de lyophilisation de virus de ces groupes.

LES MYXOVIRUS

Virus des oreillons : un travail déjà ancien donne des résultats satisfaisants (51), mais il ne s'agit sans doute que de survivance car aucune évaluation précise n'est donnée.

Influenzavirus

Les liquides allantoiques infectés et lyophilisés sans addition de stabilisateur voient leur titre infectieux baisser de 1 à 2 logarithmes (15), l'humidité résiduelle n'étant encore que de 3,8 %. D'autr auteurs (39) (94) obtiennent également des résultats variés, alors que le virus de culture cellulaire lyophilisé par RITOVA (9I) en présence de saccharose gélatiné ou de sérum de veau ne subit qu'une perte négligeable. Le virus de la Peste Bovine adapté au lapin, lyophilisé pa nos soins (70) avec un stabilisateur peptoné ne subit qu'une perte minime à la lyophilisation et présente une résistance thermique à 45°C pendant plusieurs semaines ; le virus de la peste porcine lapinisé lyophilisé se conserve 8 mois à 17°C.(34).

le virus Newcastle, souche B1 (34) se conserve moins bien puisque son titré diminue d'un logarithme en 6 mois à +4°C.

Le virus rougeoleux,: une technique récente de GREIFF (4I)montre qu'av un stabilisateur comportant 1% de lactobionate de calcium et 1% d'albumine, le titre infectieux du virus n'est pas trop abaissé par la lyophilisation encore qu'une diminution d'un logarithme soit observée en six mois de conservation à +4°C. L'instabilité en 30 à 60 minutes à 32°C annoncée par Goffe (32) est d'interprétation difficile car la for du stabilisateur ne figure pas dans la publication.

LE VIRUS RABIQUE des rues provenant de broyat de glande maxillaire infectée et additionné de 10% de sérum de lapin et de 0 à 10 % de glucose (101) ne perd, sous l'effet de la lyophilisation qu'1,5 à 2 logarithmes décimaux de son titre infectieux et se maintient ensuite sans nouvelle baisse de son titre, pendant 6 mois à + 4° C.

L'antigénicité du vaccin antirabique phéniqué, additionné d'un milieu stabilisateur comportant 1 % de gélatine 15 % de saccharose et 0,85 % de Chlorure de Sodium reste suffisante après lyophilisation ou même après conservation à 37°C, pendant une semaine (102).

Les PICORNAVIRUS fournissent des résultats assez variables.

Avec le virus aphteux adapté à l'oeuf embryonné ou cultivé sur souris et additionné d'une quantité égale de lait écrémé, Shhmidt et Veckenste (95) notent une légère amélioration du résultat de la lyophilisation pa rapport à celui du même virus lyophilisé sans addition de stabilisateur La baisse du titre infectieux reste cependant élevée, allant de 1,5 à 2 logarithmes décimaux.

Récemment, Fellowes (25) lyophilisant un virus aphteux de type O cultivé sur cellules rénales de veau et additionné de lactobionate de calcium, obtient des résultats meilleurs ; la baisse du titre infectieu restant inférieure à 1 logarithme.

Avec les entérovirus du porc cultivés sur cellules rénales porcines, Lamont et Betts (54) se contentent de constater la survie du virus aprè lyophilisation sans donner de précision permettant de se rendre compte des résultats réels.

Pour les entérovirus humains, les travaux anciens sur le poliovirus (53) (55) (8I) ne sont pas très favorables. S. Georges et P.V.Gharpure (3I) étudiant 5 souches virales différentes (poliovirus 1, Coxsackie virus B.4, Coxsackie virus A.9, ECHO virus 6 et ECHO virus 7)additionné d'une quantité égale de sérum de lapin ou de peptone à 40 % notent aprè lyophilisation un abaissement du titre infectieux de 2,5 à 5,5 logarith décimaux.

Avec un milieu stabilisateur comportant 10 % de dextran et 1o % de glucose, Tyrell et Ridgwell (100) constatent après lyophilisation de poliovirus 1, de virus Coxsackie A.7 et A.2I,d'ECHO virus 4 et 11 et de Reovirus, une baisse du titre de 1,5 à 2,5 logarithmes.

Les résultats que Greiff et Rightsel (42) obtiennent pour le poliovirus 1 additionné de différentes concentrations de lactobionate de calcium et d'albumine varient avec les conditions de congélation, de lyophilisation et même de reconstitution du produit ; la baisse du titre reste toujours assez importante, voisine ou supérieure à un logarithme. Les rhinovirus se scindent en deux catégories (100) et les rhinovirus H contrairement aux M. résisteraient sans subir aucune altération à la dessication par lyophilisation.

LES ARBOVIRUS

Malgré le grand nombre des arbovirus, on ne retrouve que peu de publications donnant des chiffres précis. Sans en connaître le rendement exact, le virus de l'encéphalite de Saint Louis (entretenu sur souris) (112) donnerait des résultats satisfaisants.

Le virus de la fièvre jaune (souche I7 D) cultivé sur oeuf embryonné reste fragile après lyophilisation (14) (75) (76) ; en particulier, le transport à longue distance doit être réalisé avec de la glace carbonique et la conservation du produit lyophilisé se fait de préférence à -25°C ce qui est assez significatif des difficultés rencontrées.

LES BACTERIOPHAGES

On dispose de quelques renseignements sur ceux du staphylocoque qui résistent bien à la lyophilisation et même durant la conservation ultérieure, lorsque le stabilisateur comporte 2,5 % de peptone, 10 % de saccharose, ou 1 % de gélatine (69).

Reprenant les différents critères de classification des virus, on peut conclure que la nature de l'acide nucléique n'influe pas sur les résultats de la lyophilisation, puisqu'aussi bien les Poxvirus, les Nitavirus que les Myxovirus ou le virus rabique, ont été lyophilisés avec succès. On aurait pu penser que la symétrie cubique ou hélicoidale aurait une certaine importance, mais les Nitavirus d'une part, le virus rabique, les Poxvirus et les Myxovirus d'autre part, se lyophilisent également bien.

L'enveloppe qui entoure la capside des virus de ces quatre groupes est un facteur commun et la sensibilité du virus varicello-zonateux de culture cellulaire tient peut être justement à l'absence de cette enveloppe au stade intracellulaire.

La présence de lipides dans la constitution de ces quatre groupes mérite également d'être souligné et l'on pourrait supposer qu'ils agissent en empêchant qu'une dessication trop poussée soit néfaste contrairement à l'ppinion première (44). Certains (59) avaient pensé que la concentration saline au cours de la lyophilisation était susceptible de dénaturer les lipoprotéines, mais comme nous venons de le voir ce sont justement les virus qui possèdent des lipides dans leur constitution qui résistent le mieux.

Il est toutefois difficile dans l'état actuel de tirer déjà des conclusions car dans le groupe de Picornavirus, qui sont dépourvus d'enveloppe et de lipides essentiels, si l'accord semble unanime au sujet de la sensibilité à la lyophilisation des poliovirus, des Coxsackivirus et des ECHO Virus, en revanche, il faut noter les bons résultats de Fellowes (25) sur le virus aphteux, et ceux de Tyrell et Ridgwell (100) qui opposent la résistance des rhinovirus H à la sensibilité des rhinovirus M.

L'étude de nouveaux critères de classification, et des travaux quantitatifs sur un nombre plus étendu de virus sont donc encore nécessaires avant de conclure.

Quoi qu'il en soit, il nous a semblé intéressant de reprendre ce problème pour le poliovirus et de tenter de savoir si la cause de ces échecs est imputable :

- à la structure du virus
- au milieu (support cellulaire ou stabilisateur)
- aux conditions de la lyophilisation (congélation, température et vitesse de lyophilisation, degré de dessication, atteinte possible des rayons lumineux, adsorption sur le verre, formation d'agglutinats, reconstitution du virus lyophilisé).

Nous avons vérifié également :

- la stabilité d'un marqueur génétique de la souche virale après lyophilisation

- la baisse d'antigénicité par rapport à celle de l'infectiosité
- la stabilité à différentes températures (sur quelques formules seulement).

Enfin, nous avons recherché si un procédé nouveau, tel que la lyophilisation en milieu non aqueux était susceptible d'apporter une solution à notre problème.

RECHERCHES PERSONNELLES

I. MATERIEL ET TECHNIQUE.

I) Le virus

Le virus choisi pour cette étude est le virus poliomyélitique de type I, souche Sabin L.Sc2ab. Le choix de cette souche nous a été dicté par son innocuité pour le personnel appelé à la manipuler à un stade ou à un autre de la lyophilisation ou des contrôles. Plusieurs lots successifs furent constitués en inoculant des cellules Hela ou des cellules HEP.2. Après 15 à 30 minutes d'adsorption d'une dose de virus, calculée pour qu'une unité virale infecte 5 à 10 cellules environ, chacun des flacons reçoit le milieu d'entretien ; celui-ci est pour les cellules HEP.2, un milieu de Melnick à l'hydrolysat de lactalbumine ajusté à l'aide de bicarbonate à un pH voisin de 7,4 et contenant 2,5 % de sérum de veau. Pour les cellules Hela, nous avons adopté le milieu de Eagle contenant 2 à 5 % de sérum de veau. Deux jours plus tard, la dégénérescence des cellules étant complète, tous les liquides de culture sont rassemblés dans un ballon et centrifugés à 1.500 tours par minute, pendant 10 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires.

Les surnageants sont alors à nouveau mélangés dans un ballon, puis répartis après agitation dans un certain nombre de tubes Pyrex, bouchés au caoutchouc à raison de 1 ou 10 ml par tube.

Dans un certain nombre d'expériences, nous avons lyophilisé du virus ayant subi un degré plus poussé de purification. La dialyse permet de se débarrasser des sels minéraux et des glucides de bas poids moléculaire contenus dans le milieu d'entretien. Le boyau cellulosique (+) est rempli avec la suspension virale à purifier puis immergé pendant 24 heures

(+) S.V.I.P, 28 rue Charles Baudelaire, Paris.

dans un récipient contenant de l'eau distillée maintenue aux alentours de + 4°C et renouvelée à plusieurs reprises au cours de la journée.

- La centrifugation de la suspension virale pendant 60 minutes à 45.000 tours (160.000 g) sur centrifugeuse "Spinco" permet de se débarrasser de la quasi totalité du milieu d'entretien et de ne reprendre le culot de virus qu'avec un milieu simple ne comportant que quelques constituants chimiques bien définis.

La Chromatographie représente un moyen supplémentaire de purification. Une centaine de ml de suspension de poliovirus est additionnée de I50 mg de sulfate de protamine pendant 30 minutes à +4°C. Au bout de ce temps, on centrifuge la suspension à 3.500 tours par minute sur Centrifugeuse "Jouan" refroidie et on ne garde que le surnageant qui est alors centrifugé pendant 60 minutes à 45.000 tours sur centrifugeuse "Spinco". On garde cette fois le culot de virus qu'on reprend avec 10 ml de solution phosphatée 0,02 M tamponnée à pH.7 et contenant 1 mg de trypsine cristallisée ; après une heure d'incubation dans un bain-marie à 37°C, on ajoute 40 ml de solution tamponnée phosphatée 0,005 M. On passe alors cette suspension sur colonne de phosphate de calcium et on élue avec des solutions tamponnées de molarité croissante, à partir de 0,1 M, la récolte du poliovirus se faisant à partir de 0,2 M pour le poliovirus Mahoney sauvage, et à partir de 0,3 M pour le poliovirus Sabin atténué.

La conservation des stocks de virus bruts ou purifiés est faite en congélateur dont la température est réglée aux alentours de moins 30°C. Les titrages répétés montrent que le titre ne varie que peu. Afin toutefois de pallier ces petites variations, nous avons refait lors de chaque expérience un témoin du jour.

2°) La lyophilisation

La plupart de nos essais furent réalisés avec un appareil à lyophiliser de marque Usifroid, type hérisson, modèle MS.I2, dont le condenseur était refroidi soit par un mélange de glace carbonique et d'alcool, soit par de l'azote liquide.

Lorsque nous avons voulu effectuer des expériences dans des conditions plus précises de pression et de température, ou à des températures plus basses, nous avons eu recours soit à l'appareil mis au point par le Professeur Rey, et décrit dans la thèse de Mademoiselle Dousset (22), soit à l'appareil mis à notre disposition par la Société "Air Liquide" dans lequel quatre ampoules sont immergées dans un bain thermostaté. Dans ces deux appareils le condenseur est refroidi par de l'azote liquide. Le premier de ces appareils a l'avantage d'enregistrer la température du produit en cours de lyophilisation alors que le deuxième appareil ne mesure que la température du bain et non celle du produit, privant ainsi l'utilisateur d'un renseignement important pour suivre la lyophilisation et rendant difficile toute transposition immédiate à un autre appareil; ce deuxième appareil est en revanche plus intéressant lorsqu'on souhaite effectuer des expériences prolongées à basse température car il est muni d'une régulation automatique précise à condition que les réserves d'azote gazeux et liquide soient suffisantes. De plus, il est facile de sceller directement les ampoules sous vide ou sous gaz inerte sans être astreint à les sortir de la chambre de lyophilisation.

Enfin, à quatre reprises, nous avons pratiqué des essais sur un nombre plus important d'ampoules avec un appareil Usifroid semi-industriel, mis à notre disposition par le Professeur Rey et muni de dispositifs de réchauffement ou de refroidissement, de mesure de la pression et de la température et permettant de mieux suivre la marche des opérations. La

congélation est faite en culot, et la lyophilisation dure 24 à 48 heures ; on scelle alors les ampoules sous azote anhydre. Les résultats sont similaires à ceux obtenus avec l'appareil MS.I2.

Le volume du produit à lyophiliser n'a jamais excédé 1 ml par ampoule Pyrex à fond rond et long col, de 5 ml de contenance ou dans le cas de l'appareil Usifroid semi-industriel, en ampoules à fond plat.

La congélation est réalisée le plus souvent en coquille les ampoules étant soit roulées à la main, soit branchées sur la tête d'une fraise dentaire par l'intermédiaire d'un bouchon en caoutchouc puis immergées dans un bain de glace carbonique et d'alcool ou d'azote liquide, Dans ce dernier cas, il est très important de brancher les ampoules rapidement sur l'appareil et de les mettre immédiatement en communication avec la source de vide afin d'éviter tout risque d'explosion causé par la dilatation brutale de l'azote sous l'effet du réchauffement de l'ampoule.

La durée de la lyophilisation est généralement comprise entre 5 et 6 heures, la disparition du givrage à l'extérieur des ampoules et l'apparence de lyophilisation étant obtenue avec l'appareil Usifroid MS.12 en 75 à 90 minutes. La durée de la lyophilisation a du être portée à 7 heures au moins, malgré un dégivrage extérieur des ampoules obtenu en 1h.30 environ, lors des essais par le procédé d'Anear où le produit à lyophiliser était en culot ; on admet généralement qu'avec l'appareil Usifroid MS.I2, la température du produit pendant la phase primaire de la lyophilisation est comprise entre -20 et -30°C.

La fermeture des ampoules est pratiquée sous vide à l'aide d'un chalumeau à 3 becs alimentés par du gaz de ville et de l'air comprimé. Nous avons pris le plus grand soin d'éviter l'échauffement du virus de l'ampoule au moment du scellage en interposant systématiquement un disque d'amiante échancré.

3°) Les Titrages.

Au début de nos expériences, le virus lyophilisé a été reconstitué avec I ml de solution de "Earle". Ensuite, et bien que nous n'ayons pas observé de phénomènes de choc osmotique ni d'amélioration des résultats, la reconstitution fut faite en ajoutant 1 ml d'eau distillée.

Pour tenir compte des expériences de Meryman (65) sur les globules rouges et de Greiff et Rightsel sur divers virus (44) nous avons réalisé un certain nombre d'essais de remise en suspension du virus lyophilisé avec les milieux hypertoniques comportant soit 20 % de polivinyl pyrolidone, soit du chlorure de sodium ou de magnesium à concentration molaire. Nous exposons dans un chapitre ultérieur les résultats de toutes ces expériences.

Le virus reconstitué est testé sur cellules H.E.P.2. ou sur cellules Hela ; un titrage "du jour" fait avec du poliovirus non lyophilisé, additionné ou non du même stabilisateur que pour la lyophilisation et conservé à -30°C, atteste que la sensibilité des cellules est correcte et permet de comparer le titre du poliovirus avant et après lyophilisation. Lorsque les cellules sont à peine confluentes, le milieu de croissance est éliminé à la trompe à vide ou en basculant le tube et remplacé par du liquide de Earle pour rincer les cellules et retirer le maximum de sérum de veau. Après trente minutes environ, on rejette à nouveau la solution de Earle et on inocule dans chaque tube un dixième de ml de suspension virale à différentes concentration. Pour chaque dilution, nous utilisons au moins cinq tubes de cellules. Après trente minutes d'adsorption environ, on ajoute par tube 1 ml du milieu d'entretien déjà décrit lors de la culture du poliovirus et contenant de 2 à 5% de sérum de veau inactivé à 56°C. pendant trente minutes.

Les portoirs sont ensuite déposés dans une étuve à 37°C et le pouvoir cytopathogène du virus est apprécié au microscope au 5è et au 7è jour.

Notre système de cotation des lésions est le suivant :

I = Lésion isolée

2 = plusieurs lésions isolées

3 = 75 % des cellules atteintes

4 = destruction totale

Sachant la rapidité de multiplication et d'extension du virus poliomyélitique, nous ne tenons compte pour les calculs que des lésions très avancées (3 ou au delà).

Le titre du virus est donné en DCT 50 par 0,1 ml ; il est calculé par la méthode de Reed et Muench en tenant compte du volume de la suspension de virus contenu au départ dans l'ampoule.

Pour chaque expérience consignée, le titre du virus est calculé d'après les résultats obtenus sur deux empoules différentes. Nous estimons en effet que si la lyophilisation est correctement effectuée, le titre infectieux ne doit pas varier sensiblement d'une ampoule à l'autre.

Chaque ampoule est titrée deux fois ; en cas de discordance des résultats, nous effectuons un troisième titrage. Lorsque la baisse du titre infectieux après lyophilisation semblait inférieure ou égale à un logarithme décimal, le nombre des essais fut sensiblement accru pour tenter d'améliorer ces résultats.

Greiff et Rightsel (42) signalent que la précision des titrages est moins bonne pour les produits lyophilisés (0,3 logarithme décimal) que pour les mêmes à l'état frais (0,2 logarithme). Nous-mêmes observons habituellement lors des titrages sur cellules Hela, des variations de $\mp$ 0,2 log.10 pour le poliovirus simplement clarifié, alors que pour le poliovirus dialysé ou pour le poliovirus lyophilisé, les variations peuvent atteindre $\mp$ 0,5 log.10. Tyrell et Ridgwell

(100) observent des variations très importantes atteignant jusqu'à deux logarithmes, mais dans ce dernier cas, il s'agissait d'ampoules différentes testées à des moments différents au cours de la conservation ce qui laisse supposer qu'il y a eu, dans leur cas, une grande irrégularité de la lyophilisation.

Dans une revue récente, Rightsel et Greiff (90) considèrent comme faible une perte de titre infectieux après lyophilisation de 0,3 à 0,5 log, comme modérée, si elle est comprise entre 0,5 et 1 log, comme forte au delà de 1 logarithme et extrême si on se trouve à la limite du titrage.

Nous pensons quant à nous, que l'intérêt de la lyophilisation dépend non seulement de la perte du titre infectieux immédiatement après la lyophilisation mais encore de la stabilité du produit au cours de la conservation, en prenant comme référence la stabilité du même produit non lyophilisé. C'est en fonction de ces critères que nous apprécierons nos propres résultats.

II. INFLUENCE DU MILIEU STABILISATEUR SUR LA SURVIVANCE DU POLIOVIRUS APRES LYOPHILISATION.

a) Support cellulaire pendant la croissance du virus.

De nombreuses discussions se sont élevées quant à l'action possible d'enzymes synthétisées ou rejetées par les cellules ou par leurs déchets. Dès 1956, BARSKI et CORNEFERT (13) démontrent que la ribonucléase n'agit pas sur le virus complet (ARN + protéine) ; HOLLAND (49) montre que l'inactivation virale par les débris cellulaires est similaire à l'inactivation par les cellules vivantes. Il ne semble donc pas que la ribonucléase qui serait conservée par la lyophilisation soit en cause pour expliquer les effets néfastes de la lyophilisation d'autant que comme ELLEN et COLTER le signalent (23) la ribonucléase cellulaire peut être inhibée par les fortes concentrations salines intracellulaires produites lors de la déshydratation, ce qui est le cas au cours de la lyophilisation.

Le métabolisme cellulaire n'étant cependant pas forcément le même (la souche cellulaire Hela contenant par exemple plus de ribonucléase), nous avons lyophilisé du poliovirus cultivé sur des systèmes cellulaires différents ; cellules Hela, HEP.2. cellules rénales de primo-explantation de singe Patas. Pour toutes ces expériences, un même volume d'extrait de levure (Yestolate "Difco" à 5%) en solution saline d'Earle était ajouté.

	Titre infectieux	
	AVANT lyophilisation	APRES lyophilisation
Virus cultivé sur cellules HEP.2.	$10^{6,62}$	$10^{5,2}$
Virus cultivé sur Hela	$10^{7,80}$	$10^{6,6}$
Virus cultivé sur T;1	$10^{5,7}$	$10^{3,7}$
Virus cultivé sur cellules rénales simiennes sans sérum.	$10^{5,8}$	$10^{3,3}$

Nous pensons donc que les ribonucléases d'origine cellulaire ne sont pas en cause dans le cas présent puisque, en particulier, les résultats avec la lignée cellulaire Hela sont comparables avec ceux de la lignée HEP.2.

b) Milieu stabilisateur

L'influence du milieu stabilisateur est bien connue et malgré les bons résultats obtenus lors de la lyophilisation du virus vaccinal et de celui de la peste bovine, nous avions constaté que tous ces milieux n'étaient pas équivalents. Dans le cas du virus poliomyélitique cultivé sur cellules in vitro et non purifié avant la lyophilisation, le milieu d'entretien est déjà complexe et contient la solution de Earle (mélange de sels minéraux et de glucose) additionnée d'extrait de levure, d'hydrolysat de lactalbumine, de sérum de veau, ou bien une association d'acides aminés comme dans le milieu de Eagle ; finalement, il n'est guère mieux défini qu'un broyat tissulaire L'avantage d'un stabilisateur est d'empêcher que le produit ne soit entraîné au cours de la lyophilisation par le courant de vapeur d'eau qui s'élimine, de diminuer la sensibilité du produit aux effets de la congélation et de la dessication, et d'augmenter sa résistance au cours de la conservation.

Diverses expériences permettent de se rendre compte de la baisse du titre infectieux lorsqu'on n'ajoute pas de stabilisateur.

	Titre infectieux	
	AVANT lyophilisation	APRES Lyophilisa
Poliovirus brut. Sabin		
- en milieu de Melnick à l'hydrolysat de lactalbumine et contenant 2,5 % de sérum	$10^{5,68}$	$10^{3,31}$
- en milieu de Eagle contenant 5 % de sérum	$10^{5,5}$	$10^{2,5}$

Poliovirus brut Mahoney	AVANT	APRES
- en milieu de Eagle contenant 5 % de sérum	$IO^{6.8}$	$IO^{3.5}$
Poliovirus dialysé Sabin		
- en milieu de Eagle contenant 5 % de sérum	IO^{5}	IO^{1}
Poliovirus Sabin purifié par centrifugation et remis en suspension dans l'eau distillée	$IO^{6.6}$	$IO^{2.I}$
Poliovirus purifié par chromatographie Sabin	$IO^{7.25}$	IO^{4}
Mahoney	$IO^{6.3}$	$IO^{2.I}$

Dans toutes ces expériences, la baisse du titre infectieux observé après lyophilisation lorsqu'aucun stabilisateur n'est ajouté préalablement, est supérieure à 2 logarithmes. Lorsque le virus est cultivé en milieu de Melnick, la baisse du titre infectieux n'est que légèrement supérieure à 2 logarithmes alors que si le virus est cultivé en milieu de Eagle, la baisse de titre est voisine ou supérieure à 3 logarithmes. Lorsque le virus est purifié partiellement par centrifugation ou dialyse, ou totalement par chromatographie, il devient encore plus sensible à la lyophilisation en l'absence de stabilisateur et la baisse de titre infectieux est habituellement supérieure à 4 logarithmes. Pour être efficace, un stabilisateur devra donc permettre d'améliorer ces résultats.

Choisir un milieu stabilisateur reste une opération délicate ; il est plausible d'essayer certaines formules ayant donné satisfaction dans d'autres cas, ; on a parfois des surprises et Greaves par exemple (38) cherchant à améliorer les résultats favorables qu'il avait obtenus pour lyophiliser Saccharomyces cerevisiae soit avec du glutamate de sodium à 5% soit avec du polivinyl-pyrolidone à IO % n'obtint que des résultats défavorables en combinant les deux stabilisateurs.

Poliovirus brut Mahoney	AVANT	APRES
- en milieu de Eagle contenant 5 % de sérum	$10^{6.8}$	$10^{3.5}$
Poliovirus dialysé Sabin		
- en milieu de Eagle contenant 5 % de sérum	10^{5}	10^{1}
Poliovirus Sabin purifié par centrifugation et remis en suspension dans l'eau distillée	$10^{6.6}$	$10^{2.1}$
Poliovirus purifié par chromatographie Sabin	$10^{7.25}$	10^{4}
Mahoney	$10^{6.3}$	$10^{2.1}$

Dans toutes ces expériences, la baisse du titre infectieux observé après lyophilisation lorsqu'aucun stabilisateur n'est ajouté préalablement, est supérieure à 2 logarithmes. Lorsque le virus est cultivé en milieu de Melnick, la baisse du titre infectieux n'est que légèrement supérieure à 2 logarithmes alors que si le virus est cultivé en milieu de Eagle, la baisse de titre est voisine ou supérieure à 3 logarithmes. Lorsque le virus est purifié partiellement par centrifugation ou dialyse, ou totalement par chromatographie, il devient encore plus sensible à la lyophilisation en l'absence de stabilisateur et la baisse de titre infectieux est habituellement supérieure à 4 logarithmes. Pour être efficace, un stabilisateur devra donc permettre d'améliorer ces résultats.

Choisir un milieu stabilisateur reste une opération délicate ; il est plausible d'essayer certaines formules ayant donné satisfaction dans d'autres cas, ; on a parfois des surprises et Greaves par exemple (38) cherchant à améliorer les résultats favorables qu'il avait obtenus pour lyophiliser Saccharomyces cerevisiae soit avec du glutamate de sodium à 5% soit avec du polivinyl-pyrolidone à 10 % n'obtint que des résultats défavorables en combinant les deux stabilisateurs.

Nous donnons maintenant ci-dessous la longue liste des divers essais de stabilisateurs que nous avons essayés.

Milieux stabilisateurs complexes

Nous groupons dans cette rubrique des milieux biologiques mal définis dont l'action est connue de longue date (38) (73)

- Le lait écrémé :

Le lait écrémé protège le virus herpétique et les agents de la psittacose contre les effets de la congélation et améliore la conservation sous froid (3). Schmidt et Veckenstedt (95) avec le virus aphteux additionné d'un volume égal de lait écrémé obtiennent des résultats voisins de ceux que nous obtenons avec le poliovirus. Tyrrell et Ridgwell (100) se satisfont d'une baisse du titre infectieux de deux logarithmes pour quatre souches de virus parainfluenzae additionnées d'un volume égal de lait écrémé car la conservation à température ambiante est correcte pendant quinze jours ; pour le virus respiratoire syncitial, cette méthode fut la seule acceptable; malgré la perte immédiate de deux logarithmes du titre infectieu l'infectiosité s'est ensuite maintenue pendant 16 mois à + 4°C. Orfila (74) lyophilisant des broyats de souriceau inoculés de virus ECHO 9 et additionnés de lait obtiendrait de bons résultats immédiats et tardifs, la reconstitution du produit lyophilisé se faisant avec du bouillon peptoné.

Les résultats que nous avons obtenus avec ce stabilisateur ne sont pas favorables :

	Titre infectieux	
	AVANT lyophilisation	APRES lyophilisation
Poliovirus non purifié au lait à 20 % en eau distillée	$10^{6.37}$	$10^{3.3}$.

	avant	après
Poliovirus non purifié aa lait à 10 % en eau distillée	$I0^{6.6}$	$I0^{4.6}$.
Poliovirus non purifié aa lait pur	$I0^{6.7}$	$I0^{5}$.
Poliovirus non purifié I0% lait pur 90%	$I0^{6.6}$.	$I0^{3}$.

Pollard (81) qui a lyophilisé du poliovirus provenant de cerveau de souris et, additionné de 3 % de lait écrémé n'obtient pas de meilleurs résultats, le titre infectieux du virus baissant de 3 logarithmes après lyophilisation.

Le sérum

Greaves (35) par adjonction de sérum réussit à améliorer la survie du gonocoque et Ritova (9I) celle du virus de l'Influenza. Le sérum jouerait le rôle d'un colloide protecteur pendant la congélation. Il ne semble pas en ce qui concerne le virus poliomyélitique, que le sérum agisse ainsi, car, comme nous le montrerons, la perte virale se produit à un stade ultérieur. Dans nos expériences, nous avons utilisé comme stabilisateur des sérums dépourvus d'anticorps antipoliomyélitique pour le type de virus à lyophiliser.

	Titre infectieux	
	AVANT lyophilisation	APRES lyophilisation
Sérum pur de cheval sans anticorps et non inactivé + virus non purifié aa	$I0^{6.4}$	$I0^{3.4}$
Sérum de cheval à I5 % en eau distillée sans anticorps et non inactivé + virus pur non purifié aa	$I0^{6.4}$	$I0^{4.7}$
Sérum de cheval I5 % en eau distillée sans anticorps et inactivé + virus non purifié aa	$I0^{5.78}$	$I0^{4.37}$

Un stabilisateur à base de sérum pur n'est donc pas favorable. Nous rejoignons les résultats d'autres auteurs (3I) qui ont effectué sans succès des lyophilisations de poliovirus I, de virus Coxsackie A.9 de culture cellulaire ou provenant de l'encéphale de singe ou de souriceau, et de muscle de souriceau pour le virus Coxsackie B.4.

Par contre, le sérum de cheval à I5 % ajouté à volume égal au virus poliomyélitique non purifié (concentration sérique finale de 8,7 % en tenant compte des 2,5 % existant déjà dans le milieu) n'abaisse le titre infectieux après lyophilisation que de 1,4 log., pour autant que le sérum soit inactivé à 56°C pendant 30 minutes afin d'éliminer une partie des inhibiteurs non spécifiques.

Les milieux de culture bactériologique

Divers milieux bactériologiques complexes sont testés quant à leur pouvoir stabilisateur éventuel ; ils sont préparés à 10 % en eau distillée puis additionnés de virus poliomyélitique et lyophilisés :

	Titre infectieux	
	AVANT lyophilisation	APRES lyophilisation
Milieu "Brain Heart" Difco" aa poliovirus non purifié	$10^{7.5}$	$10^{4.8}$
Milieu "Tryptic soy broth" Difco" aa poliovirus non purifié	$10^{7.3}$	$10^{5.5}$
Milieu Tryptic digest broth "Difco" aa poliovirus non purifié	$10^{7.3}$	$10^{4.6}$
"Yeast extract" Difco" aa poliovirus non purifié	$10^{7.3}$	$10^{5.1}$

Les résultats furent décevants comme le sont également les essais suivants avec du jaune d'oeuf additionné à partie égale de virus poliomyélitique :

	Titre infectieux	
	AVANT lyophilisation	APRES lyophilisation
Jaune d'oeuf	$10^{7.5}$	10^{3}

Stabilisateurs de nature protidique

L'addition de substance protidique pour protéger les virus contre les effets de la dessication est logique ; on en ajoute même au cours des titrages de virus pour les protéger des effets de la température ambiante.

Peptone

De nombreux auteurs utilisent la peptone pour la lypphilisation de divers virus. L'équipe de l'Institut Lister (20) (21) d'Angleterre y a fait appel et a mis au point un vaccin antivariolique particulièrement stable.

Nous-mêmes l'avons utilisé pour fabriquer avec le virus de la peste bovine adapté au lapin, un vaccin lyophilisé résistant à la chaleur (70).

Les essais de KRAFT et POLLARD (53) sur le virus poliomyélitique type 2 (souche MEF.1) adapté à la souris donnent des résultats variables que nous pouvons résumer ainsi : Le mélange de 10 à 20 % de broyat de cerveau de souris à 50 % en eau, avec 80 à 90 % de solution peptonée de 10 à 30 % ne subit qu'un demi-logarithme de perte si la lyophilisation est faite en maintenant les ampoules dans une enceinte réfrigérée autour de 0°C. Par contre, cette perte dépasse 1 logarithme si l'on ne refroidit pas les ampoules pendant la lyophilisation ou si on remplace la solution peptonée.

Récemment, NAGEL et Col.(68), en Hollande ont fait des tentatives de conservation du pouvoir antigénique du vaccin antipoliomyélitique inactivé par lyophilisation en présence d'une quantité égale de peptone à 10 % et de Sorbitol 10 %.

La baisse du pouvoir antigénique observée fut de 30 à 66 % pour le type 1, 50 à 72 % pour le type 2 et supérieure à 99 % pour le type 3.

Par ailleurs, S. George et P.V. Gharpure (31) n'ont obtenu que de piètres résultats en additionnant plusieurs souches de poliovirus, de virus Coxsackie et ECHO de peptone à 40 %.

Il est difficile de savoir si la peptone agit dans ces expériences simplement comme ballast ou comme le prétend GREAVES en neutralisant les groupes carbonyles à l'aide des groupes aminés, la perte du pouvoir infectieux provenant de l'altération des protéines cellulaires par la réaction entre les groupes carbonyles et les fonctions amines des protéines.

Les essais que nous avons pratiqués en associant à partie égale du virus poliomyélitique et une solution de peptone (bactopeptone Difco") à 5,5 % ou 10 % en eau distillée ne permettent pas de retrouver les résultats que POLLARD avait obtenu avec un virus poliomyélitique d'un autre type adapté à la souris.

	Titre infectieux	
	AVANT lyophilisation	APRES lyophilisation
Peptone 5,5 % aa poliovirus non purifié (moyenne de 4 opérations différentes de lyophilisation).	$10^{6.67}$	$10^{4.56}$
Peptone 10 % aa poliovirus en Eagle 2.5 % sérum et dialysé (lyophilisation en bain marie à + 0°C)	$10^{4.83}$	$10^{1.62}$.

Extrait de levure ("Yeastolate" Difco)

La différence essentielle de cet extrait par rapport au "Yeast extract" déjà étudié réside dans la clarification supplémentaire de l'autolysat de levure fraîche. Certains

auteurs utilisent l'extrait de levure pour freiner l'action des ribonucléases cellulaires (99). Comme celles-ci n'agissent pas sur le virus complet, il est peu probable que ce soit par ce mécanisme que l'extrait de levure intervienne.

Vieu et Diverneau (104) ont réussi à lyophiliser des bactériophages avec une perte d'infectiosité de 30 % seulement en utilisant un stabilisateur contenant de la peptone et du moût de bière.

Nous préparons l'extrait de levure à 5% en Earle ou à 10 % en eau distillée et filtrons la solution sur filtre Seitz EKS.2. La courbe de réchauffement (voir figure) que nous devons à l'obligeance de Monsieur Lefèvre du centre d'Etude cryogénique de l'Air liquide à Sassenage est assez régulière. Pour les lyophilisations, on ajoute une quantité équivalente de poliovirus et de solution d'extrait de levure "Yestolate".

	Titre infectieux	
	AVANT lyophilisation	APRES lyophilisatinn
Poliovirus non purifié aa "Yestolate" à 5% en Earle (moyenne de 10 opérations différentes de lyophilisation)	$10^{6.45}$	$10^{4.86}$
Poliovirus non purifié aa "Yestolate" à 5% en milieu de Melnick à l'hydrolysat de lactalbumine et 2.5 % de sérum de veau.	$10^{6.5}$	$10^{4.47}$
Poliovirus non purifié 1 vol. "Yestolate à 5% en eau 9 vol.	$10^{6.9}$	$10^{4.5}$
Poliovirus en Eagle 2.5 % sérum et dialysé aa "Yestolate" à 10 % en eau (lyophilisation-en bain marie à + 0°C.	$10^{6.09}$	$10^{3.8}$

	avant	après
Poliovirus Sabin purifié par centrifugation, remis en suspension en eau distillée aa Yestolate à 5% en eau	$10^{6.76}$	$10^{3.75}$
Poliovirus Sabin 1, purifié par chromatographie, aa "Yestolate" à 5 % en Earle.	10^{6}	$10^{3.8}$
Poliovirus Mahoney purifié par chromatographie, aa "Yestolate" à 5% en Earle.	$10^{6.3}$.	$10^{3.9}$
Poliovirus Mahoney non purifié aa "Yestolate" à 5% de Earle.	$10^{6.7}$	$10^{3.7}$

Les résultats, acquis avec le poliovirus non purifié additionné de "Yestolate" à 5% en Earle et lyophilisé sur l'appareil Usifroid MS.I2 à température ambiante, ont montré dans certains cas une baisse de titre infectieux inférieur à 1 logarithme et nous ne donnons ici que la moyenne des résultats de 10 opérations différentes. Il nous a semblé cependant intéressant d'essayer d'améliorer ces résultats en réalisant d'autres expériences sur lesquelles nous reviendrons ultérieurement et d'étudier certains paramètres.

La gélatine

STAMP, cité par GREAVES (36) obtient de bons résultats pour la lyophilisation des bactéries sauf le méningocoque à l'aide d'un stabilisateur composé de gélatine à IO % et d'acide ascorbique. Ungar (cité par 30) constate qu'une stabilisation du B.C.G. peut être obtenue avec 5 % de gélatine.

Ritova (9I) obtient aussi des résultats intéressants pour le virus de l'influenza avec un stabilisateur composé de gélatine et de saccharose . KRAFT et POLLARD l'ont essayé à la concentration de 0,5 % pour stabiliser le poliovirus de type 2 (ampoules refroidies pendant la lyophilisation) la perte fut de 3 log. Nous l'avons essayé à la concentration de 1°/oo en eau

distillée et associé à un volume égal de virus poliomyélitique. Le titre infectieux est passé de $10^{6.5}$ avant la lyophilisation à $10^{4.89}$ après lyophilisation.

L'albumine.

C'est un constituant normal du sérum qui entre dans la composition de plusieurs stabilisateurs mixtes spécialement lorsqu'on désire éliminer le sérum pour éviter des anticorps ou des phénomènes de sensibilisation à l'occasion d'injection thérapeutique. Employée seule, la baisse du titre infectieux est considérable puisque pour le mélange à partie égale de poliovirus brut et d'albumine à 10 % en solution d'Earle, elle passe de 10^5 à un taux voisin de 10^1.

Arginine :

Le Docteur Bonin de Francfort (communication verbale) prétend avoir obtenu dans d'autres cas de bons résultats avec cet acide aminé. Le chlorhydrate d'Arginine à la concentration de 10 % en eau distillée est ajouté à partie égale avec le virus poliomyélitique. Après seulement 4 heures de laborieuse lyophilisation sur appareil USIFROID MS.12 le pouvoir infectieux tombe de $10^{5.9}$ à moins de $10^{2.25}$; les expériences sont reprises avec de l'arginine à 2.5 % et du poliovirus purifié par dialyse; la lyophilisation est menée, le produit étant dans un bain marie à 0°C. Le titre infectieux est passé de $10^{4.31}$ avant lyophilisation à 10^1 après lyophilisation.

Glutamate :

De nombreux auteurs ont utilisé le glutamate de sodium pour lyophiliser divers germes. Cho et Obayashi (19) l'ont proposé pour améliorer la conservation du B.C.G. Greaves (35) insiste sur ce corps qui agirait en neutralisant les groupes carbonyles et en empêchant le produit de devenir trop sec, Récemment, Chatelain (18) est revenu sur la question et il démontre que l'addition de 2 % de glutamate dans du bouillon

contenant déjà 25 % de sérum améliore la stabilité thermique à 100°C. sans diminuer cependant la baisse immédiate du titre infectieux lors de la lyophilisation de 7 souches bactériennes (lactobacille, streptococcus, chromobacterium, Pseudomonas, Moraxella, Erivinia). Pour Annear, (8) la concentration la plus favorable de glutamate pour la lyophilisation des salmonelles est comprise entre 5 et 20 %. Fayet (24) ne note aucun effet bénéfique sur la lyophilisation du virus aphteux, alors que le glutamate est utilisé depuis 1950 pour la conservation sous froid des Rickettsies (16).

Nous avons préparé avec le milieu d'entretien de Melnick contenant déjà 2.5 % de sérum de veau des solutions de glutamate à 20 %, 10 % et 4 %. Le premier stabilisateur à 20 % de glutamate ne nous permit pas de lyophiliser le poliovirus avec l'appareil Usifroid MS.I2 par suite de décongélation. Les autres stabilisateurs ont donné les résultats suivants :

	Titre infectieux	
	AVANT lyophilisation	APRES lyophilisation
Poliovirus non purifié aa Glutamate à 10 % en milieu à l'hydrolysat de lactalbumine + 2.5 % sérum.	$10^{6.7}$	10^{4}
Poliovirus non purifié aa Glutamate à 4 % en milieu à l'hydrolysat de lactalbumine + 2.5 % sérum.	$10^{6.1}$	$10^{4.35}$.

En fait, le glutamate est rarement utilisé seul ; son action serait plus favorable avec les glucides à chaîne longue (Obayashi cité par(30) . Nous reviendrons ultérieurement sur les résultats que nous avons obtenus avec des solutions mixtes.

b - Cystine

Il y a 40 ans que Muller d'une part, Zinsser, et Tang d'autre part, (cités par 107) ont montré que le virus du sarcome de Rous et celui de l'Herpès pouvaient être stabilisés par la L. Cystine.
KRAFT et POLLARD (53) l'ont essayé sans succès pour lyophiliser le virus poliomyélitique type 2. Par contre, POHJANPELTO (78) (79) (80) puis d'autres (50) prétendent stabiliser le virus poliomyélitique non lyophilisé vis à vis des variations thermiques. La L. cystine réduirait les liaisons SH des protéines virales en S - S, empêchant ainsi l'oxydation en cours d'échauffement. En fait, l'action de la l-cystine est variable suivant le type et les souches (79), le type 1 atténué de Sabin est moins bien stabilisé que d'autres souches sauvages de type 1 (50).

La préparation de la solution est délicate car il est nécessaire de solubiliser la l-cystine par de l'acide chlorhydrique fumant puis de neutraliser par de la soude sans atteindre la zone de précipitation.

Nous avons choisi la concentration de 5 mg %, qui est celle qui a le mieux stabilisé le poliovirus non lyophilisé vis à vis de la chaleur et avons parfois incubé le mélange à 3 5°C comme dans les expériences de Pohjanpelto (78) (80) et dans celles de Wallis et Melnick (107).

	Titre infectieux	
	AVANT lyophilisation	APRES lyophilisation
Poliovirus non purifié aa L.cystine à 5 mg broyée dans 100 ml de Hanks.	$10^{6.8}$	$10^{3.62}$
Poliovirus non purifié aa L-cystine 5 mg pour 100 ml d'eau distillée pH.6,7.	$10^{6.8}$	$10^{3.91}$

	Avant	Après
Poliovirus non purifié aa L-Cystine 5 mg pour 100 ml d'eau distillée Incubatimn du mélange 20 heures à 35°C avant lyophilisation.	$10^{6.8}$	$10^{4.4}$.

La cystine, si elle peut stabiliser le virus en phase liquide est inefficace pour le protéger des effets de la lyophilisation ce qui peut se comprendre si on pense que les réactions chimiques ou enzymatiques sont bien ralénties par le froid.

Stabilisateurs de nature glucidique

Leshchinskaya (citée par 37) montre l'intérêt du glucose pour la lyophilisation du B.C.G. Fry et Greaves (29)confirment ces résultats pour une concentration de glucose de 5 à 10 %. Le glucose agirait d'après ces auteurs en empêchant l'humidité résiduelle de tomber en dessous de 1 % ; cependant, les groupes carbonyles communiquent au produit une instabilité aux températures élevées, c'est pourquoi le saccharose (37) remplace le glucose dans certaines formules comme celle du "Histdesicans" de Greaves. Ce dernier auteur pense toutefois (35) que les virus supportant généralement bien une très faible humidité résiduelle, le saccharose n'est pas nécessaire.

D'après Greiff (42), le sorbitol aurait une certaine action protectrice spécialement lors de la congélation (ce qui n'est pas le moment critique dans le cas du poliovirus) alors que son action est nulle sur les phases ultérieures de la lyophilisation.

Le Dextran, polysaccharide macromoléculaire est un stabilisateur rarement utilisé seul, plus souvent associé à divers autres substances (saccharose, glutamate, glucose). Ungar l'emploie

pour lyophiliser du B.C.G.(cité par 30). L'association à partie égale d'une solution en eau distillée de dextran et de glucose à 10 % à divers entérovirus ou réovirus cultivés sur cellules permet à Tyrell et Ridgwell (100) de lyophiliser divers entérovirus et rhinovirus, avec de bons résultats pour les rhinovirus II et une baisse de titre infectieux de 2,5 logarithmes pour le poliovirus 1.

Nous donnons ci-dessous les résultats que nous avons obtenus avec différentes concentrations des substances énumérées ci-dessus :

	Titre infectieux	
	AVANT lyophilisation	APRES lyophilisation
Poliovirus non purifié aa Saccharose à 10 % en eau distillée.	$10^{6.5}$	10^{4}
Poliovirus non purifié aa glucose à 10 %	$10^{6.58}$	$10^{4.5}$.
Poliovirus non purifié aa lactose à 10 % en Earle	$10^{6.31}$	$10^{4.5}$.
Poliovirus non purifié aa Sorbitol à 10 % en eau distillée.	$10^{6.58}$	10^{4}
Poliovirus non purifié 9 vol; Sorbitol à 10 % en eau distillée: 1 volume.	$10^{6.58}$	10^{4}
Poliovirus non purifié 9 vol; Dextran sans glucose à chaine longue P m 80.000 à 6% en soluté physiologique : 1 volume.	$10^{6.61}$	$10^{4.9}$

Stabilisateurs simples divers

Thioglycollate.

Etudiant la sensibilité du poliovirus à un chauffage de 15 minutes à 50°C Wallis et Melnick (107) observent l'action

bénéfique du thioglycollate à I%. Il ne semble pas que ce soit simplement en créant un état d'anaérobiose que le thioglycollate agisse car vérifiant l'anaérobiose sur une série parallèle, par la formation de leucodérivé du bleu de méthylène, ces mêmes auteurs montrent que la désoxygénation (sans doute accompagnée du retrait du CO^2) par barbotage d'azote pendant 2 heures n'a pas la même efficacité que l'addition de 0,10 % seulement de thioglycollate ou celle d'autres acides organiques non réducteurs (benzoate de sodium, disodium éthylène diamine tétra-acétate).

Alors qu'avec du bouillon thioglycollaté, Pollard (81) observe une baisse du titre infectieux de deux logarithmes par lyophilisation à température ambiante de poliovirus type 2, MEF.1 adapté à la souris, Kraft et Pollard (53) en 1954, n'observent qu'une baisse d'un demi-logarithme après lyophilisation d'un mélange constitué par du broyat de cerveau à 50 % en eau distillée dilué 10 fois avec une solution de thioglycollate à 5 %.

Examinant leurs résultats, nous constatons que le titre avant lyophilisation est faible par rapport aux titres obtenus avec d'autres stabilisateurs, ce qui laissait supposer une atteinte de virus à température ambiante avant même la congélation.

Reprenant ces expériences dans des conditions similaires, nous n'avons pas trouvé d'atteinte du virus après une heure de contact à température ambiante. Nous n'avons pas retrouvé non plus les résultats annoncés par Kraft et Pollard. L'effet protecteur vis à vis de la chaleur démontré par Wallis et Melnick (I07) pour le virus frais n'est pas transposable à la lyophilisation.

	Titrage immédiat	après une heure, température ambiante	après congélation	après lyophilisation
Poliovirus Sabin 1 non purifié aa, thioglycollate à 5% en eau distillée.	$10^{5.68}$	$10^{5.62}$	$10^{5.41}$	$10^{3.62}$

Le Polyvinyl pyrolidone (P.V.P)

Son mode d'action est assez mal connu. Il agirait (71) comme simple "ballast" ou comme enrobant (43), en protégeant les cellules ou les bactéries contre les effets de la congélation ou d'une rehydratation trop brutale.

Les résultats sont souvent influencés par la provenance du produit (8). Nous avons quant à nous testé l'action du P.V.P. de poids moléculaire 30.000 mis gracieusement à notre disposition par les laboratoires Rhône Poulenc.

	Titre infectieux	
	AVANT lyophilisation	APRES lyophilisation
Poliovirus non purifié aa P.V.P. à 20 % en eau distillée.	$10^{5.37}$	$<10^{1}$
Poliovirus dialysé aa P.V.P. à 20 % en eau distillée (lyophilisation en bain-marie) à + 4°C.	$10^{4.83}$	$<10^{1}$
Poliovirus non purifié aa P.V.P. à 20 % en eau distillée (lyophilisation en bain marie à 0°C.).	$10^{5.50}$	$<10^{1}$
Poliovirus non purifié aa P.V.P. à 10 % en Earle.	$10^{5.50}$	$10^{3.62}$
Poliovirus non purifié aa P.V.P. à 20 % en Earle	$10^{5.17}$	$10^{2.55}$

Le Tris (hydroxymethyl) amino-méthane.

Il peut remplacer le bicarbonate dans les milieux de culture et permet une croissance cellulaire dans des tubes simplement bouchés au coton. Pensant qu'un départ de CO_2 sous l'effet de la dépression pouvait être responsable de nos difficultés, nous avons remplacé le bicarbonate du milieu par du "Tris". En fait, la décomposition du bicarbonate est modérée au cours de la lyophilisation et la mesure du pH sur des produits décongelés au fur et à mesure de la lyophilisation et reconstitués, a montré une certaine constance.

Le Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Commercial Solvant Corporation de New-York) est broyé au mortier (15 g de Tris pour 15 ml d'eau bidistillée) on ajoute ensuite 100 ml de solution d'acide chlorhydrique (5,8 ml dans 100 ml d'eau). On stérilise pendant trois quart d'heure au bain marie bouillant et on ajoute 20 ml de la solution par litre de milieu ; le remplacement du bicarbonate par le "Tris" ne présente aucun avantage et nous constatons une perte de titre infectieux de 2,7 lag. après lyophilisation.

La simple addition de "Tris" à un milieu classique bicarbonaté n'est guère plus efficace (perte de 2,4 log).

Le Dimethylsulfoxyde (DMSO)

Le dimethylsulfoxyde est utilisé pour protéger les cellules contre la cristallisation brutale à basse température (10) (83) et non contre la dessication. Dans le cas présent, nous y reviendrons, la congélation n'est pas responsable de la perte virale.

Greiff et Rightsel (44) montrent que les titres du poliovirus en suspension dans un milieu contenant du D.M.S.O. ne diffèrent pas sensiblement de ceux des témoins ; Wallis et Melnick (110) notent l'intérêt du D.M.S.O pour congeler les virus munis d'une enveloppe ce qui n'est pas le cas du poliovirus.

Les résultats ci-dessous confirment ceux des auteurs précités concernant l'innocuité du D.M.S.O. pour le Poliovirus; le D.M.S.O. cependant n'améliore pas la conservation sous froid qui est excellente en son absence et n'offre aucun intérêt pour la lyophilisation.

	Titre infectieux	
	AVANT lyophilisation	APRES lyophilisation
Poliovirus non purifié 9 vol. Diméthylsulfoxyde 1 vol.	$10^{6.58}$	$<10^{4}$
Poliovirus non purifié aa Diméthylsulfoxyde	$10^{6.58}$	$<10^{4}$

Le chlorure de magnesium

Il est recommandé par Melnick et Wallis (106) (108) (110) à concentration molaire pour accroître la résistance thermique du poliovirus. On pouvait cependant craindre dans notre cas un abaissement de la température de l'eutectique.

	Titre infectieux	
	AVANT lyophilisation	APRES lyophilisation
Poliovirus non purifié aa Chlorure de magnesium à 10 % en milieu de croissance à 15 % sérum.	$10^{6.4}$.	$<10^{4}$
Poliovirus non purifié aa Chlorure de magnesium à 1 °/oo en milieu de croissance à 15 % sérum	$10^{6.4}$.	10^{4}

Nous pensons qu'au cours de la lyophilisation, il se produit une concentration de ce sel, probablement néfaste puisque déjà la concentration de 10 % est plus néfaste que celle de 1 °/oo. Il est peut être même possible, comme le cas est démontré par WALLIS pour les réovirus que la simple concentration saline sous l'action du froid puisse expliquer une partie du phénomène (109).

Stabilisateurs mixtes

Les diverses substances que nous avons déjà énumérées sont le plus souvent associées pour tenter de bénéficier des avantages des unes ou pallier aux inconvénients des autres. Certaines formules comme les "mist desicans" de Greaves ont déjà été utilisées avec succès pour lyophiliser les bactéries. D'autres formules comme celles des solutions A.C.D. ou E.D. donnent satisfaction pour conserver le sang à + 4°C dans les centres de Transfusion. L'association d'albumine et de lactobionate a fait l'objet d'une vaste enquête sur la lyophilisation des virus par Greiff et Rightsel (44) ; à ce sujet, lorsqu'un produit est susceptible d'être injecté à l'homme, il est indispensable que le virus soit aussi purifié que possible et que le milieu stabilisateur ne comporte pas de sérum par crainte des accidents de sensibilisation ou même d'hépatite virale si le donneur recélait des virus de l'hépatite au moment de la prise de sang, d'où l'intérêt de l'albumine qui remplace le sérum.

Pour d'autres formules enfin, nous avons tout simplement associé plusieurs stabilisateurs simples dont nous pensions qu'ils pourraient conjuguer leur effet pour accroître la résistance du poliovirus à la dessication.

	Titre infectieux	
	AVANT lyophilisation	APRES lyophilisation
Poliovirus non purifié aa Sérum de poulain contenant 0,I % de chlorhydrate de cystine.	$I0^{6.59}$	$I0^{4.8}$
Poliovirus non purifié aa Sérum de poulain contenant 0,1 % de chlorhydrate de cystine. (Incubation du mélange 20 heures à 35°C. avant lyophilisation)	$I0^{5.42}$	$I0^{3.83}$

	Titre infectieux	
	AVANT lyophilisation	APRES lyophilisation
Poliovirus non purifié aa "Yestolate 5% en Earle, + cystine et incubation du mélange 20 heures à 35°C. avant lyophilisation)	$10^{4.76}$	$10^{3.26}$.
Poliovirus non purifié aa Sérum de poulain 15 ml Glutamate de sodium 10 g Saccharose 2 g Milieu hydrolysat lactalbumine q.s.100 ml. (lyophilisation sur appareil Usifroid M.S.J)	$10^{6.5}$	$10^{4.4}$
Poliovirus non purifié aa lait 20 ml Glutamate de sodium 10 g Saccharose 2 g Milieu à l'hydrolysat lactalbumine q.s/100 ml. (lyophilisation sur appareil Usifroid M.S.J.).	$10^{6.55}$	$10^{3.3}$.
Poliovirus non purifié aa "Mistdesicans" n° I pH 6,7 (Albumine 10 g (Glutamate 2 g (Saccharose 10 g (Eau q.s.100 ml.	$10^{6.7}$	$10^{4.50}$
Poliovirus non purifiée aa "Mistdesicans" n° 2 pH 6,7 (Albumine 10 g (Glutamate Na 10 g (Saccharose 2 g (Eau q.s. 100 ml.	$10^{6.5}$	$10^{5.05}$
Poliovirus non purifié aa Albumine bovine 1 g Lactose 10 g Acide glutamique 0,02 g Solution tamponnée phosphatée potassique q.s.100 ml.	$10^{6.3}$	10^{3}

	Titre infectieux AVANT lyophilisation	Titre infectieux APRES lyophilisation
Poliovirus non purifié aa (Polivinylpyrolidone 25 (Peptone 2 (Eau q.s. 100	$10^{6.6}$.	$<10^{4}$
Poliovirus non purifié aa Polyvinylpyrolidone 10 (P.m.30.000) Glutamate 2 Saccharose 2 Eau q.s. 100	$10^{6.6}$.	$10^{4.95}$
Poliovirus Mahoney non purifié aa Dextran (pm.80.000) 5 g Glucose 5 g Eau distillée q.s.100 ml.	$10^{6.9}$	$10^{3.5}$.
Poliovirus Sabin non purifié aa Dextran (p.m 80.000) 10 g. Glucose 10 g Eau q.s. 100 ml.	$10^{5.45}$	$10^{2.9}$
Poliovirus non purifié aa Dextran (p.m 80.000) 6 g Glutamate 1 g Saccharose 5 g Eau q.s. 100 ml.	$10^{6.61}$	10^{4}
Poliovirus non purifié 9 vol. Dextran (p.m.80.000) 6 g Glutamate 1 g 1 vol. Saccharose 5 g Eau q.s. 100 ml.	$10^{6.71}$	$10^{4.4}$.
Poliovirus non purifié aa Dextran (p.m.80.000) 4 g Glutamate 10 g Milieu à l'hydrolysat de lactalbumine q.s. 100 ml (lyophilisation effectuée sur appareil Usifroid M.S.J. sous la direction du Pr. Rey).	$10^{6.61}$	$10^{4.9}$

	Titre infectieux	
	AVANT lyophilisation	APRES lyophilisation
Solution ED		
Poliovirus non purifié aa		
Cl_2 Mg, $6H_2O$ 0,034		
Glucose 1,5		
Edta (versène) 0,408	$10^{6.7}$	10^{4}
Gluconate de Ca 0,364		
Eau q.s. 30 ml		
Solution A.C.D.		
Poliovirus non purifié aa		
Citrate trisodique 1,97		
Acide citrique 0,50 aa	$10^{6.7}$	10^{5}
Glucose 1,50		
Eau q.s. 75 ml.		
pH 5,2		
Poliovirus non purifié aa		
L.glutamate de L.arginine 25 g	$10^{6.1}$	$10^{3.8}$
Sorbitol 40 g		
Eau q.s. 100 ml		
(Nécessité de disposer les ampoules dans des logettes de polystyrène pour empêcher la décongélation).		
Poliovirus non purifié aa		
L. glutamate de L.arginine 6,25 g	$10^{6.1}$	$10^{4.1}$
Sorbitol 10 g		
Milieu de Eagle à 5% de sérum q.s.100ml.		
Poliovirus Sabin non purifié en milieu de Eagle à 5% de sérum aa		
Lactobionate de calcium 6 g		
Albumine bovine 2 g	$10^{6.9}$	$10^{4.2}$
Eau q.s. 100 ml.		

	Titre infectieux	
	AVANT LYOPHILISATION	APRES LYOPHILISATION
Poliovirus Sabin non purifié en Milieu de Eagle sans sérum aa Lactobionate de calcium 6g Albumine bovine 2g Eau q.s. 100ml	$10^{7.5}$	$10^{4.3}$
Poliovirus Sabin non purifié en milieu de Parker 2 % sérum veau 1 volume	$10^{6.9}$	$10^{3.5}$
Lactobionate de Calcium 1 g) Albumine 1 g) 9 vol. Milieu Parker q.s.100.)		
Poliovirus Sabin purifié par chromatographie aa Lactobionate de Calcium 6 g Albumine bovine 2 g Milieu de Parker q.s. 100 ml.	$10^{6.50}$	$10^{2.32}$
Poliovirus Mahoney non purifié en milieu de Eagle sans sérum. aa Lactobionate de Calcium 6 Albumine bovine 2 Eau q.s. 100 ml.	$10^{7.5}$	$10^{3.6}$
Poliovirus Mahoney purifié par chromatographie aa Lactobionate de Calcium 6 g Albumine 2 g Milieu Parker q.s. 100 ml	$10^{6.7}$	$10^{3.3}$.
Poliovirus Sabin non purifié) 9 vol. Lactobionate de calcium 10 g) Albumine bovine 10 g) 1 vol. Eau q.s. 100ml)	$10^{6.7}$	$10^{4.6}$.

Les mauvais résultats obtenus avec la solution E.D. ne nous surprennent pas car Peloux et Col (77) ont montré que le versène était virulicide en solution.

Malgré de nombreuses tentatives, nous n'avons pas constaté d'avantage particulier à la solution proposée par Greiff et Rightsel.

De ces premiers essais et nous référant aux titres observés après lyophilisation en l'absence de tout stabilisateur on peut penser que la purification du poliovirus le rend encore plus sensible aux effets de la lyophilisation. Parmi les milieux complexes, le lait, le sérum, l'extrait de levure "Yestolate" la gélatine permettent de réduire les effets néfastes de la lyophilisation.

Les glucides à l'exception du dextran n'amènent que peu d'amélioration. Parmi les solutions mixtes, la L.cystine renforce nettement l'activité protectrice du sérum de poulain spécialement lorsque le mélange avec le poliovirus est mis à incuber à 35°C pendant 20 heures avant la lyophilisation; cette dernière formule est encore loin d'être parfaite puisque la perte d'infectiosité après lyophilisation reste encore supérieur à 1 logarithme.

A ce stade de notre travail, il nous a semblé intéressant de voir quels facteurs physiques sont susceptibles d'influer sur les résultats de la lyophilisation.

III. INFLUENCE DE QUELQUES FACTEURS PHYSIQUES SUR LA SURVIVANCE DU POLIOVIRUS APRES LYOPHILISATION.

Toute lyophilisation commence par la congélation du produit. C'est donc par l'étude de ce premier facteur que nous commencerons notre étude.

a) La congélation

La congélation est généralement plus mal supportée par les bactéries que par les virus. Nous n'avons pas fait appel aux congélations très rapides de l'ordre de 1.000°C. par seconde que l'on peut obtenir par immersion d'un film de 75 µ d'épaisseur enrobé dans du collodion, dans un bain d'isopentane à -I50°C; la vitrification obtenue est trop instable et le relèvement de la température indispensable pour que la tension de vapeur d'eau soit suffisante pour permettre la lyophilisation entraîne une recristallisation (11). La vitesse de congélation adoptée pour nos expériences fut habituellement plus modérée, de l'ordre de 2 à 20°C par seconde ; les ampoules contenant de 0,1 à 1 ml du produit à lyophiliser en "coquille" ou en "culot" sont immergées dans un mélange de glace carbonique et d'alcool ou dans un bain d'azote liquide.

Bien que les essais n'aient pas été faits avec tous les stabilisateurs, nous citons un certain nombre de résultats qui démontrent que la perte de virulence ne se produit pas à ce stade.

	Titre infectieux	
	Avant congélation	Avant décongélation
Poliovirus Mahoney type I en milieu de Eagle sans sérum	$10^{7.1}$	$10^{7.1}$
Poliovirus Sabin I en milieu de Eagle sans sérum	$10^{6.1}$	$10^{5.9}$
Poliovirus Sabin I aa Lait écrémé "Oxoid"	$10^{6.37}$	$10^{6.16}$
Poliovirus Sabin I aa Glucose à 10 %	$10^{6.50}$	$10^{6.50}$
Poliovirus Sabin I Sérum cheval aa	$10^{6.16}$	$10^{6.37}$
Poliovirus Sabin I.aa Extrait de levure à 5 % en Earle.	$10^{6.16}$	$10^{6.16}$
Poliovirus Sabin I - 0,9 ml Dimethylsulfoxyde 0,1 ml	$10^{6.16}$	$10^{5.83}$
Poliovirus Sabin I P.V.P. 20 % aa	$10^{6.37}$	$10^{6.37}$
Poliovirus Sabin I Thioglycolate 1°/oo aa	$10^{5.68}$	$10^{5.41}$

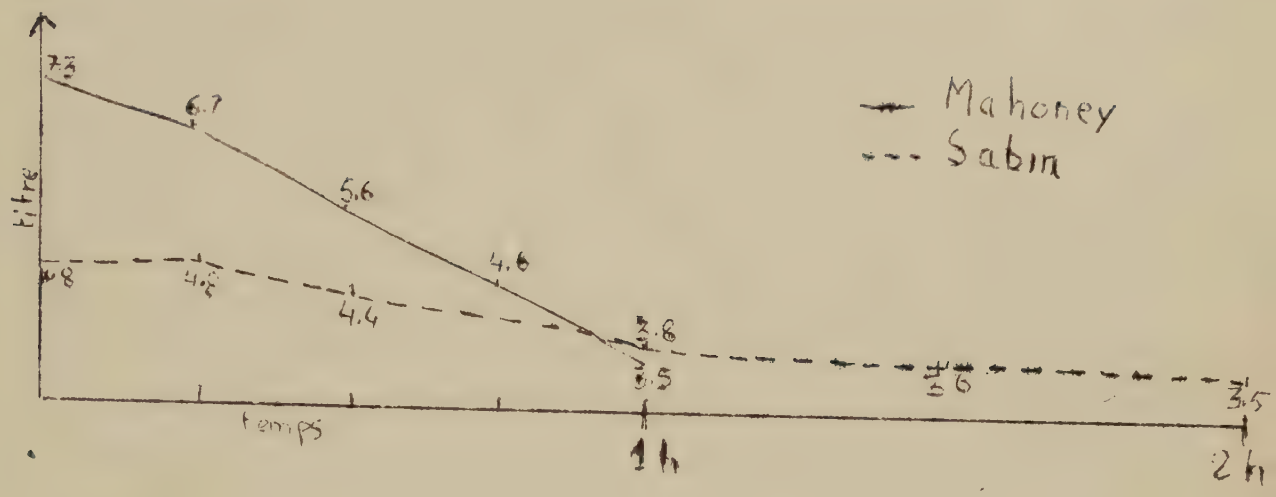
N'ayant pas observé de variations de titre avant congélation et après décongélation, nous ne discuterons pas pour savoir si la perte observée provient de la congélation ou de la décongélation ; cette dernière opération ne doit d'ailleurs pas se produire au cours d'une lyophilisation bien conduite.

Nos observations rejoignent celles de Rightsel et Greiff (90) qui n'ont pas observé de variations du titre infectieux du poliovirus en milieu de Parker additionné ou non de dimethylsulfoxyde, ou de lactobionate et d'albumine, puis congelé à -20, -40 et -76°C.

b) Evolution du titre en cours de lyophilisation.

Puisque la congélation semble pouvoir être mise hors de cause, il est intéressant de savoir à quel moment au cours de la lyophilisation se situe la plus grande perte de titre infectieux. Après congélation en coquille, on branche quelques ampoules seulement sur le lyophilisateur USIFROID M.S.I2 afin d'avoir un rythme rapide de dessication ; le virus Mahoney est cultivé en milieu de Eagle à 5% de sérum de veau et n'est pas additionné de stabilisateur ; le virus Sabin est cultivé sur le même milieu mais est additionné de Yestolate à 5 % en Earle pour la lyophilisation ; le volume de liquide est noté au départ dans chaque ampoule et l'on complète avec de l'eau distillée au moment des prélèvements échelonnés. En 1/4 d'heure, le virus a déjà perdu 0,6 ml d'eau sur 1 ml de liquide au départ; après 30 minutes, il faut 0,9 ml pour retrouver le volume de départ et après une heure en reconstitue avec 1 ml d'eau distillée. Nous voyons sur le tableau ci-dessous le titre du virus en ordonnée et le temps en abcisse :

Nous concluons d'après ces graphiques que la diminutions du titre infectieux commence dès le début de la lyophilisation et continue assez régulièrement au fur et à mesure de la progression du front de lyophilisation.



C) <u>L'adsorption du virus par le verre</u> des ampoules est bien connue ; avec certains verres, SABIN (communication verbale) eut recours au Tween 80 pour maintenir la stabilité du titre du virus poliomyélitique.

- Une première série d'expériences montra que l'évolution du titre infectieux d'une même suspension de poliovirus gardée à +4°C dans les deux types d'ampoules "Pyrex" utilisées tout au long de ce travail était identique à celle de la même suspension déposée en tube Pyrex 8/8.
- Lors d'une deuxième série d'expériences, l'addition d'une solution à I% de Tween 80 au virus poliomyélitique à lyophiliser n'améliore nullement les résultats.
- Une troisième série d'expériences prouve que la remise en suspension avec une solution à I% de Tween 80 du virus lyophilisé par divers procédés n'augmente pas le titre infectieux par rapport à celui du virus lyophilisé dont la remise en suspension se fait avec de l'eau distillée. Il n'existe donc aucun masquage du virus et nous pouvons conclure que la qualité du verre des ampoules n'est pas en cause, l'adsorptinn du virus sur les parois n'étant pas non plus augmentée par la lyophilisation.

d) L'atteinte possible du virus par les radiations lumineuses.

Alors que MOORE, HELPRIN et HIATT (67) à la suite d'expérience d'irradiation en présence de bleu de toluidine classent le virus poliomyélitique parmi les virus résistants aux ultra-violets, d'autres auteurs, en particulier, LE BOUVIER (56) utilisent au contraire les ultra-violets pour compléter l'action inactivante du formol ou de la chaleur sans nuire au pouvoir antigénique. A noter d'ailleurs que pour LE BOUVIER, le type 3 de virus poliomyélitique serait moins sensible que les autres.

Afin d'étudier ce phénomène, nous avons entouré les ampoules avec du papier argenté pour les mettre à l'abri de la lumière, mais les conditions thermiques engendrées par cette modification ont provoqué la décongélation du produit avant toute lyophilisation.

Nous avons alors effectué avec la même suspension virale et pendant un temps identique, une lyophilisation en ampoule Pyrex ordinaire et en ampoules de verre teinté. Les résultats sont les suivants :

Titre Infectieux		
Avant lyophilisation	Après lyophilisation	
	Verre Pyrex	Verre teinté
$10^{6.5}$	$10^{4.5}$	$10^{4.7}$

L'action des radiations ultraviolettes n'est donc pas en cause ; d'ailleurs, il est bien connu qu'une faible paroi de verre est susceptible d'arrêter ces radiations.

c) La concentration du virus

En analysant les résultats de KRAFT et POLLARD (13), on constate que la lyophilisation de broyats à 20 % d'encéphale de singe atteint de poliomyélite donnent toujours des résultats supérieurs à ceux obtenus avec des broyats à IO % seulement.

Il existe certainement un effet de masse et le virus résiste mieux s'il est plus concentré. Toutes nos expériences concordent sur ce point :

		Titre infectieux avant lyophilisation	Titre infectieux après lyophilisation
I	Lait pur 9 Vol. Poliovirus 1 vol.	$10^{6.5}$	10^{3}
	Lait pur aa Poliovirus	$10^{6.8}$	10^{5}
II	Sérum pur aa Poliovirus dilué au 1/10è	$10^{6.4}$	10^{2}
	Sérum pur aa Poliovirus	$10^{6.8}$	$10^{3.4}$.
III.	Lactobionate de calcium 6g. Albumine bovine 2 g. Eau q.s.100 ml. Poliovirus pur aa	$10^{7.5}$	$10^{4.3}$
	Lactobionate de calcium 6g. 1 vol. Albumine bovine 2 g Eau q.s.100 ml Poliovirus pur 9 volumes.	$10^{6.7}$	$10^{4.6}$

Dans ces trois groupes d'exemples, les résultats sont meilleurs chaque fois que le virus est plus concentré. Nous rejoignons les conclusions de Vieu et Col.(104) sur la lyophilisation du Lysotype A de Salmonella typhi et celles de Fry (30) qui, conclue que la concentration des bactéries intervient spécialement lorsque la perte du pouvoir infectieux est importante, les organismes morts constituants alors une barrière de protection pour les survivants.

f) le pH

Melnick et Wallis (64) ont observé que le titre infectieux du poliovirus 1 stabilisé par du chlorure de magnésium M et congelé vers -25°C est stable au bout de 10 jours à +20°C si le pH est compris entre 6 et 6,4 ; la baisse du titre infectieux est minime (0,3 log) à pH.5 et non négligeable (1 log) à pH.7 Pour EBBA LUND (60) l'inactivation du poliovirus à 37°C dépend de deux réactions, l'une spontanée prédominant à pH neutre devient intense à pH élevé, l'autre oxydative devient importante aux bas pH, à moins qu'un oxydant ne soit ajouté à pH 7

Nos expériences indiquent qu'un pH légèrement acide, compris entre 5,5 et 6,5 semble protéger le virus poliomyélitique ou tout au moins renforcer sa résistance au cours de la lyophilisation.

		Titre infectieux	
	pH	Avant lyophilisation	Après lyophilisation
Poliovirus non purifié aa Yestolate 5 % en Earle	7.2	$10^{6.5}$	10^{5}
	6.8	"	$10^{5.3}$
	6.5	"	$10^{5.6}$
	5.5	"	$10^{5.5}$
	4.5.	"	$10^{4.6}$

Les pH cités dans nos expériences sont les pH pris avant congélation du produit. Dès la congélation, un virage du rose au jaune traduit une diminution du pH. Van den Berg et Rose, cités par Meryman (65) utilisant une électrode spéciale pour la mesure du pH des produits congelés, ont constaté que l'abaissement du pH des eutectiques contenant du chlorure de sodium peut être inférieur à 4. A ce sujet l'abaissement serait moins net, voisin seulement de 6 pour les eutectiques contenant à la place du sodium, des sels de potassium. La résistance du poliovirus à un abaissement de pH, confirmée par le maintien de l'infectiosité du poliovirus après congélation suivi de décongélation permet cependant de conclure que ce facteur n'est pas responsable de la chute brutale de l'infectiosité du poliovirus en cours de lyophilisation.

g) Le degré de dessication

Suivant l'opinion de Greaves (35) qui considérait que, contrairement aux bactéries, les virus résistaient d'autant mieux que la dessication était plus poussée, on avait fixé à 1 % la limite habituelle de l'humidité résiduelle. Etudiant la conservation à 28 et à 36°C du virus de l'influenza lyophilisé, Greiff (44) conclut que la baisse du pouvoir infectieux est moins importante si le taux d'humidité résiduelle est compris entre 1 et 2 % que s'il est de l'ordre de 0,4 à 0,6 %. En revanche, pour le virus aphteux de culture cellulaire additionné d'un stabilisateur à base de lactobionate de calcium et d'albumine et lyophilisé à différentes températures, la baisse du titre infectieux est de l'ordre de 0,6 à 0,9 logarithme pour des taux d'humidité résiduelle compris entre 0,1 et 0,5 % alors qu'avec un autre stabilisateur contenant 2 % de glutamate de sodium et 5 % de sérum de veau, l'abaissement du titre infectieu est de l'ordre de 1,5 logarithme, le taux d'humidité résiduelle étant compris entre 1 et 2 % (25).

Le fait même que le titre infectieux du virus poliomyélitique soit instable au cours de la lyophilisation puis pendant la conservation laisse supposer que le degré de dessication pourrait être en cause. Nous avons vu que dès le début de la lyophilisation le titre infectieux diminue ; les expériences suivantes montrent que la prolongation de la phase secondaire n'améliore pas les résultats et qu'une fois un certain pallier atteint, le titre infectieux reste pratiquement inchangé.

Appareil USIFROID M.S.I2		Titre infectieux selon la durée de la lyophilisation.	
		3 heures	7 heures
Poliovirus non purifié aa "Yestolate à 5% en solution de Earle (pH.5.1).		$10^{5.5}$	$10^{6.2}$.
Appareil "USIFROID" M.S.J.		36 heures	60 heures
Poliovirus non purifié aa			
lait	20 ml	$10^{3.3}$.	$10^{3.3}$.
glutamate de sodium	10 g		
saccharose	2 g		
Milieu à l'hydrolysat de lactalbumine q.s/100 ml.			
Appareil "USIFROID" M.S.J.		26 heures I5	30 heures I5
Poliovirus non purifié aa			
Sérum de poulain	15 ml		
Glutamate de sodium	10 g	$10^{4.4}$.	$10^{4.4}$.
Saccharose	2 g		
Milieu à l'hydrolysat de lactalbumine q.s/100 ml.			

Il semble donc d'après nos résultats sur le poliovirus que comme pour le virus aphteux (25) un taux faible d'humidité résiduelle soit plutôt bénéfique ou tout au moins non nocif.

h) La vitesse de lyophilisation

Ni la congélation du début, ni la dessication de la phase secondaire ne sont responsables de la dégradation du virus ; l'atteinte virale est progressive pendant toute la phase de dessication primaire.

Dans les expériences suivantes, nous avons cherché à accélérer ou à ralentir la vitesse de la lyophilisation au cours de cette phase primaire pour tenter de minimiser l'atteinte du virus.

- Augmentation de la vitesse de lyophilisation.

1°) le moussage : Si on fait le vide à la surface d'un produit liquide, ce dernier se met à mousser, augmentant ainsi la surface d'évaporation. C'est d'ailleurs pour éviter de phénomène que Greaves avait fait adapter un système centrifuge à l'intérieur de la chambre à lyophiliser des appareils "Edwards PREVOT (communication verbale) utilise avec sudcès le procédé du moussage pour les germes anaérobies. Dans la pratique, il nous a suffi de brancher sur le même lyophilisateur une fraction des ampoules contenant le produit congelé et une autre fraction contenant la suspension liquide de poliovirus. Nous n'avons pas constaté d'avantage en faveur du moussage préalable (titre infectieux $10^{4.83}$ sans moussage, et 10^{5} avec moussage. Témoin du jour $10^{6.7}$)

2°) la lyophilisation de faible volume

Elle peut se faire sans support, ou en deux temps, comme dans le procédé d'ANEAR.

En lyophilisation 0,05 ml de virus poliomyélitique par ampoule, nous obtenons des titres du même ordre que dans les lyophilisations de 1 ml par ampoule.

Dans le procédé d'ANEAR, adopté pour certains germes fragiles (4) (5) on stérilise au bain marie bouillant une suspension de peptone 5,5 % et d'amidon 0,5 % qu'on répartit

ensuite à raison de 1 ml par ampoule. Après congélation en culot et lyophilisation, on ajoute une faible quantité d'un germe à lyophiliser et on reprend la marche des opérations. Plus récemment, le procédé a été amélioré par Annear en déposant un faible volume de bactéries (6) ou de levures diverses (5) sur une trame cellulosique introduite dans une ampoule ; il ne semble pas cependant que les résultats fussent améliorés par rapport au simple dépôt du même volume de suspension sans trame cellulosique. Reprenant ces expériences, nous avons préalablement lyophilisé des culots de peptone et d'amidon pendant 7 heures, après quoi, chaque ampoule est débranchée successivement et on ajoute rapidement à la pipette 0,05 ml de virus poliomyélitique ; on tape alors le fond de l'ampoule sur la table pour faire descendre la goutte sur la galette peptonée et on rebranche immédiatement l'ampoule sur le lyophilisateur Usifroid MS.I2, puis on passe à l'ampoule suivante. Après une heure trente, on scelle les ampoules sous vide.

Nous n'entrerons pas dans la discussion pour savoir s'il s'agit d'une dessication ou d'une véritable lyophilisation, autrement dit, si le virus ajouté est desséché sans congélation préalable ou s'il est congelé d'abord ; pour nous en tenir aux résultats, cette méthode ne présente, dans notre cas, aucun avantage par rapport aux techniques habituelles : le titre du virus est tombé à $10^{5.I}$ ($10^{6.6}$ pour le témoin du jour) ce qui représente une perte non négligeable.

3°) <u>La congélation du produit en coquille</u>

Pour une même ampoule de 5 ml contenant 1 ml de produit à lyophiliser, la surface d'évaporation est susceptible de varier de 0,78 cm2 à 15,70 cm2 selon que le produit est congelé en culot ou en coquille. Comme par ailleurs la puissance de la pompe à vide et du condenseur de l'appareil Usifroid M.S.I2 est

largement suffisante compte tenu du faible volume d'eau à éliminer, il est indéniable qu'en augmentant la surface d'évaporation, on augmente la vitesse de la lyophilisation, ce que l'on constate aisément en notant les temps de dégivrage des ampoules en cours de lyophilisatinn. Les expériences suivantes permettent de comparer les résultats pour un même produit congelé en culot ou en coquille et lyophilisé au cours de la même opération :

	Titre infectieux avant lyophilisation	Titre infectieux après lyophilisation	
		culot	coquille
Poliovirus non purifié, cultivé en HDL + 2.5% de sérum de veau.	$10^{5.68}$	$10^{3.3I}$	$10^{3.62.}$
Poliovirus non purifié cultivé en H.D.L. + 2.5% de sérum de veau aa Yestolate à 5% en Earle	$10^{5.5.}$	$10^{3.93}$	$10^{3.59.}$
Poliovirus non purifié cultivé en Eagle 5 % de sérum de veau aa. Yestolate 5% en eau distillée (lyophilisation en bain marie à -30°C)	$10^{5.87}$	$10^{3.75}$	$10^{2.5.}$

Le mode de congélation ne semble pas intervenir dans nos expériences sur le résultat final étant entendu que la durée de la lyophilisation n'est pas la même, ce qui tendrait à prouver que la vitesse de lyophilisation n'est pas critique à température ambiante.

4°) Injection d'azote en cours de lyophilisation.

Nous avons pensé accélérer le processus de lyophilisation en entraînant la vapeur d'eau par un courant d'azote R.

Les ampoules contenant le poliovirus non purifié, additionné d'un volume égal de "Yestolate" à 5%, congelé en "culot", sont disposées dans le bain marie thermostaté à la température voulue. Par une tubulure plongeant au travers d'une vanne, on introduit de l'azote à proximité des ampoules en réglant le débit pour que la pression reste voisine de 2,4 . 10-2 mm. de mercure alors qu'on atteint habituellement 10^{-2} à 10^{-3}. On obtient les résultats suivants :

	Titre infectieux	
	Avant lyophilisation	Après lyophilisation
- 35°C	$10^{6.5}$	10^{6} (mal lyophilisé après 24 heures).
- 30°C	$10^{5.87}$	$10^{3.75}$
- 25°C	$10^{6.37}$	$10^{2.87}$
- 15°C	$10^{6.25}$	10^{4}
- 0°C	$10^{6.3I}$	$10^{4.83}$

Parmi les températures envisagées, celle de 0°C semble la moins défavorable ; cependant si on se rappelle qu'à 20°C et sans injection d'azote, la baisse du titre infectieux était en moyenne de 1,6 log. On admettra que l'injection de gaz en cours de lyophilisation ne présente ici pas d'avantages.

- Ralentissement de la vitesse de lyophilisation.

Si l'accélération de la lyophilisation ne nous permet pas d'atteindre les résultats escomptés, peut être en ralentissant au contraire les opérations, pourrions nous diminuer les pertes. LANDSTEINER et LEVADITI (55) ont bien réussi en 1909 à dessécher sur potasse des moelles de singe atteint de poliomyélite, mais compte tenu des difficultés de titrage sur singe à l'époque, il n'est pas possible de connaître le rendement de l'opération.

Plus près de nous, LEVINTOW et DARNELL (58) en 1960 concentrent les liquides surnageants de culture de virus poliomyélitique sous pression réduite, la température étant inférieure à 35°C.

D'autres expériences de dessication en présence de pourcentage d'humidité variables montrent à BUCKLAND et TYRREL (17) que les entérovirus supportent mieux, au cours de la dessication de microgouttes de o,0001ml, une humidité relative de 84 % obtenue à 20°C dans un dessicateur contenant une solution saturée de bromure de potassium, qu'une humidité de 20 % obtenue par une solution saturée d'acétate de sodium, la perte étant environ trois fois moindre ; bien entendu, une forte humidité ne peut que ralentir la dessication. CE qui fait qu'on peut se demander si, comme pour les adénovirus, le fait d'être dépourvu de lipides n'est en relation avec la nécessité d'un certain pourcentage d'humidité au cours de la dessication.

POLSON et HAMPTON (82) par chauffage pendant 9 heures à 33°C ramènent le volume initial au 1/10.

Tous ces travaux démontrent l'avantage de la lenteur de la concentration du virus également confirmée par POLLARD (8I); en fait, il ne s'agit pas de lyophilisation, le produit n'étant pas congelé. Ces différents auteurs n'ont utilisé cependant ce procédé que dans un premier temps et non pour dessécher complètement le virus, c'est pourquoi nous avons repris ces expériences

- <u>Dessication</u>

On met un ml. de virus poliomyélitique dans un couvercle de boite de Pétri disposé dans un dessicateur contenant de l'actigel. A l'aide d'une trompe à vide, on fait le vide dans le récipient pendant 2 heures à température ambiante, puis on transporte le dessicateur dans un réfrigérateur à +4°C jusqu'au moment du titrage du virus, soit 18 heures plus tard environ.

	Titre infectieux	
	Avant dessication	Après dessication
Poliovirus Sabin	$10^{6.7}$	$10^{4.7}$
Poliovirus Mahoney	$10^{6.50}$	$10^{4.3I}$

Nous n'avons pas fait de titrage pour savoir si la baisse du titre infectieux se produit dès le départ comme dans la lyophilisation, ou seulement à partir d'une certaine concentration. Les résultats ci-dessus montrent cependant bien que la dessication lente est aussi néfaste que la lyophilisation qu'il s'agisse de souches atténuée ou sauvage.

.. Lyophilisation à basse température.

Il existe un véritable moyen de ralentissement de la lyophilisation qui consiste à maintenir le produit à lyophiliser à une température assez basse pour éviter le réchauffement par l'air ambiant, et à refroidir le condenseur de l'appareil à lyophiliser avec de l'azote liquide.

Si on étudie les courbes de variation de la résistance électrique au cours du refroidissement d'une solution de Earle, solution saline base des milieux de culture (43) (66) (57) on constate un certain nombre d'accidents en relation avec la température des eutectiques des électrolytes présents dans la solution. C'est ainsi qu'à -I6°C correspond celui du phosphate de sodium, à -22°C, celui du chlorure de sodium et à -55°C celui du chlorure de salcium. En lyophilisant à une température supérieure à celle de l'eutectique, il y a un risque de concentration saline au fur et à mesure de la sublimation de l'eau, ce qui dans le cas présent pourrait être préjudiciable à la survie du virus. La lyophilisation à basse température est cependant limitée par la pression de vapeur de la glace qui diminue rapidement au fur et à mesure de l'abaissement thermique.

Pression de vapeur de la glace (d'après Meryman 66)

°C	Pv mm.Hg	°C	PV mm Hg
0	4.58	-50	0.029
-10	1.95	-60	0.008
-20	0.776	-70	0.002
-30	0.286	-80	0.0004
-40	0.097	-90	0.00007
		-100	0,00001

La température de lyophilisation est interprétée de plusieurs manières selon les auteurs. Le plus exact serait certes de noter la température du produit lui-même. En fait, le fonctionnement des sondes est parfois défectueux aux très basses températures si bien qu'il n'est souvent fait mention que de la température du bain marie dans lequel sont immergées les ampoules. La température du produit est inférieure à celle du bain marie compte tenu de la perte de chaleur latente due à l'évaporation de la vapeur d'eau ; cet écart entre la température du produit et celle du bain marie est important au début des lyophilisations effectuées à température ambiante avec l'appareil Usifroid MS.I2.; cet écart est sans doute plus faible pour les lyophilisations lentes effectuées à basse température.

Greiff (42) a conçu spécialement un appareil permettant de travailler à très basse température (-76°C) et comportant des joints spéciaux et surtout une pompe à diffusion à 3 étages.

Greiff (42) a étudié systématiquement les effets de la lyophilisation du poliovirus préalablement congelé à -20°C, -40° -76°C, soit (dans ses propres conditions d'expérience en ampoules préalablement refroidies) à la vitesse de 1,5 à 15°C par minute. La lyophilisation est ensuite menée en maintenant les ampoules en bains maries dont les températures sont

comprises entre 0°C et -76°C. La diminution du pouvoir infectieux variait de 2,2 à 3,7 logarithmes ; la baisse minimale de titre pour le stabilisateur comportant 3 % de lactobionate et 1% d'albumine se situait lorsque les ampoules du produit à lyophiliser étaient disposées dans un bain marie à 0°C, ou à -76°C. Dans ce dernier cas d'ailleurs, la baisse pourrait être réduite à néant si le produit est immédiatement conservé à -40°C (90). On ne peut donc conclure des expériences de Greiff que la concentration saline en cours de lyophilisation a été néfaste puisque les deux températures optimales se situent de part et d'autre de celle de l'eutectique.

Il ne nous a pas été possible en l'absence de pompe à diffusion de réaliser des expériences à basse température, de l'ordre de -70°C. En effet, malgré un écart de température suffisant entre celle du produit à lyophiliser et celle du condenseur à azote liquide la tension de vapeur est trop faible.

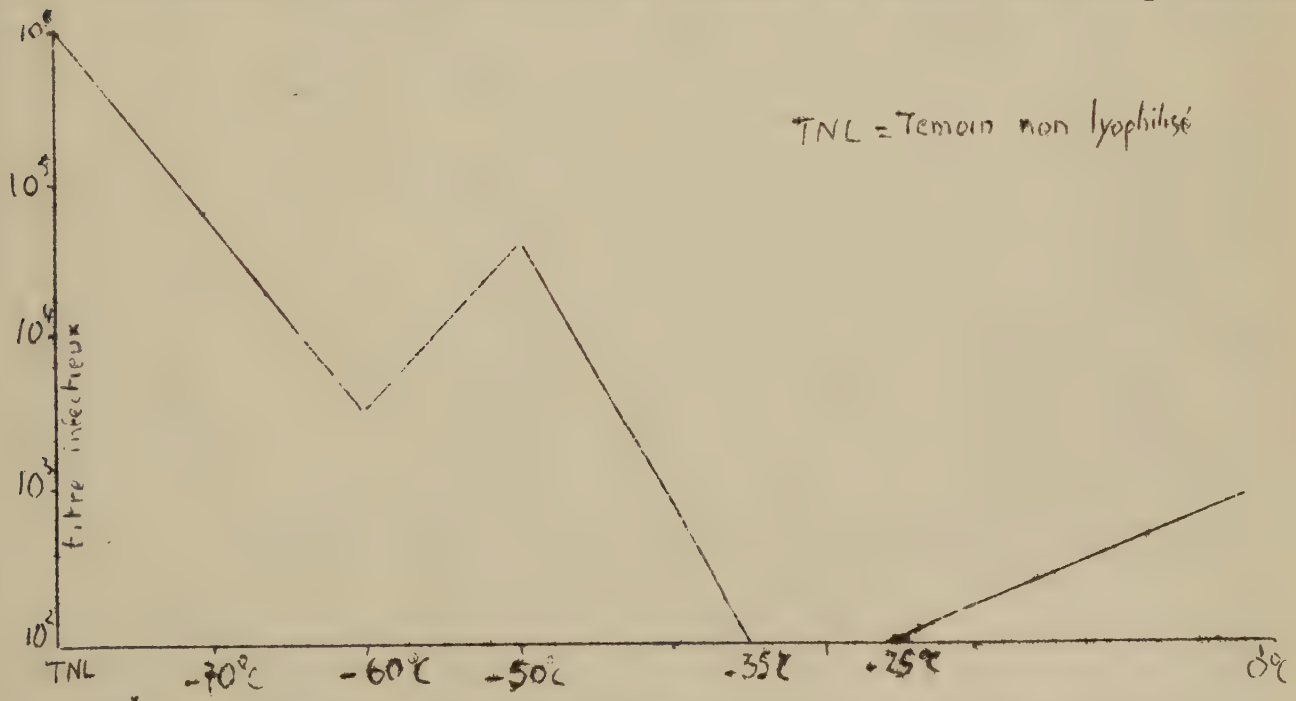


Schéma comparant les titres infectieux après lyophilisation en fonction de la température (stabilisateur = Yestolate à 5 % en Earle).

Les résultats les moins défavorables sont ceux obtenus à température ambiante (déjà cités) et ceux des produits lyophilisés à -50°C pendant un certain temps. A basse température, le volume du produit à lyophiliser ne doit pas excéder 0,1 ml.

I) La reconstitution de la suspension virale après lyophilisation

. Dissociation des agglutinats lyophilisés

Sous l'effet de la lyophilisation, un certain nombre de particules peuvent être agglutinées comme c'est le cas pour le vaccin B.C.G.(85), donnant lieu, lors des titrages à une erreur par défaut puisque chaque amas viral peut ne donner lieu qu'à une seule plage. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé deux techniques différentes de dissociation.

I) Les ultrasons :

Le virus poliomyélitique lyophilisé sans aucun stabilisateur est reconstitué avec de l'eau distillée puis titré ; le restant de la suspension est alors ultrasoné pendant 5 minutes à températures ambiante à l'aide d'un appareil "Ultrasonic" de puissance 60 Kcv.

Les résultats des titres infectieux sont les suivants :

Avant lyophilisation	Après lyophilisation	
	non ultrasoné	ultrasoné
$10^{6.5}$	$10^{3.5}$	$10^{3.7}$

II) La trypsine :

Le virus poliomyélitique Sabin type I additionné d'une quantité équivalente de "Yeastolate" à 5% en Earle est lyophilisé. Après reconstitution des ampoules par de l'eau distillée, la première série des suspensions virales est diluée en Earle pour titrage alors que la deuxième série est diluée d'abord dans une solution de trypsine à 0.2% pendant 20 minutes à température ambiante puis en Earle ; nous donnons ci-dessous les résultats des titrages de deux ampoules différentes ainsi traitées :

Avant lyophilisation	Après lyophilisation	
	non trypsinée	trypsinée
$10^{5.9}$	$10^{2.85}$	$10^{2.92}$

Il ne semble donc pas que la formation d'agglutinats en cours de lyophilisation soit responsable de la baisse importante de titre infectieux car, ni les ultrasons, ni la trypsine n'ont modifié les résultats d'une manière sensible.;

.. Emploi des solutions hypertoniques pour la remise en suspension du virus lyophilisé.

Les essais suivants ont pour but de se rendre compte si la baisse du titre infectieux observé après lyophilisation ne résultait pas de la dessication, mais de la reconstitution du produit lyophilisé ; en atténuant la brutalité de la rentrée d'eau dans le produit par l'emploi de solution concentrée plus ou moins visqueuses, on pourrait peut être éviter un phénomène de choc osmotique.

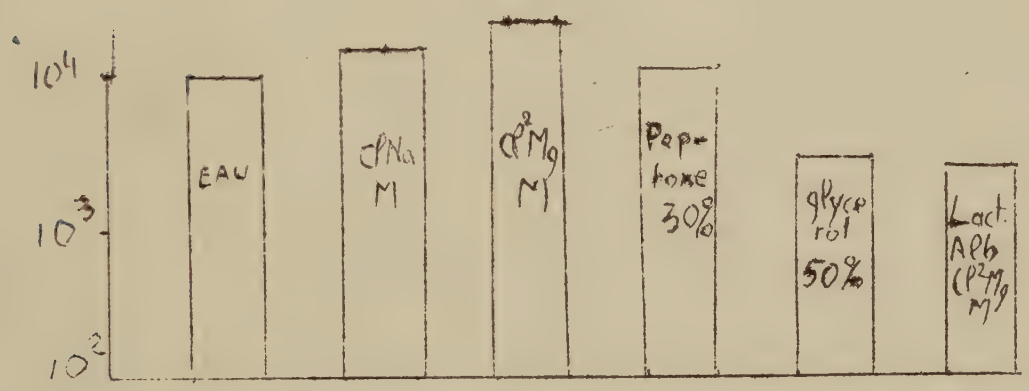
Kraft et Pollard (53) avaient déjà noté l'effet bénéfique de la reconstitution du poliovirus MEF.1 lyophilisé, par une solution de peptone à 30 %.

Merryman avait observé que la remise en suspension des globules rouges lyophilisés donnait de meilleurs résultats lorsqu'on employait une solution de polyvinylpyrrolidone à 20%. Par ailleurs, Greiff (40) avait constaté lui aussi le net avantage qu'il y avait à reconstituer les mitochondries lyophilisées avec une solution de polyvinylpyrrolidone à 3% ou de dextran à 5%. La viscosité même de ces solutions empêche la rentrée brutale d'eau dans le produit lyophilisé.

Les essais de reconstitution que nous avons nous mêmes pratiqués avec une solution de P.V.P. à 20 % au lieu d'eau distillée furent décevants.

Wallis et Melnick (108) ont montré l'intérêt des ions sodium et magnesium à concentration molaire pour renforcer

Les résultats montrent que la remise en suspension du virus Sabin lyophilisé, par une solution molaire de chlorure de sodium n'offre que peu d'avantage par rapport à la remise en suspension avec de l'eau distillée. Il en est de même d'autres essais pratiqués en reconstituant le virus lyophilisé avec de la peptone à 30 %, avec de la glycérine tamponnée à 50 % ou avec une solution de lactobionate de calcium additionnée d'albumine et de chlorure de magnesium.



Titre infectieux après lyophilisation en fonction du liquide de reconstitution.

Titre infectieux du virus lyophilisé reconstitué avec différentes solutions.

	Eau distillée	Cl2 Mg M	Peptone à 30 % en eau	Glycérine tamponnée à 50 %	Lactobionate 1% albumine 1% + Cl 2 Mg/M.
Poliovirus non purifié	$10^{3.62}$		$10^{2.83}$		
Poliovirus non purifié aa albumine à 10 % en Earle		10^{1}	$10^{1.50}$		
Poliovirus non purifié aa glutamate Na à 4% en milieu de Melnick		$10^{3.50}$		$10^{3.16}$	
Poliovirus non purifié aa albumine 10 glutamate Na 10 Saccharose 2 Eau q.s. 100 ml.		$10^{2.62}$		$10^{1.30}$	
Poliovirus non purifié aa Sérum poulain inactivé contenant 0.I % cystine et incubé 20 heures à 36°.		$10^{3.62}$		$10^{2.62}$	
Poliovirus non purifié	$10^{3.31}$				$10^{1.68}$
Poliovirus non purifié aa lactose à I0 % en Earle		$10^{3.5}$			$10^{2.84}$
Poliovirus non purifié aa P.V.P. à 10 % en Earle		$10^{2.62}$			$10^{1.37}$
Poliovirus non purifié aa Yestolate à 5% en Earle		$10^{3.83}$			$10^{3.83}$

De tous ces essais, nous rejoignons les conclusions de Greiff quant à l'intérêt du chlorure de magnesium à concentration molaire pour reconstituer le virus lyophilisé.

Il est intéressant de noter que l'emploi de ces mêmes solutions hypertoniques est préconisé pour stabiliser les acides ribonucléiques du poliovirus ou pour préparer les cellules destinées au titrage de ces mêmes A.R.N.

I) Etat du virus

. Etude de la mise en liberté éventuelle d'A.R.N. infectieux par lalyophilisation.

Le virus poliomyélitique possède une symétrie cubique et sa faible taille facilite in vitro la séparation d'un acide nucléique intact ayant gardé son pouvoir infectieux, contrairement aux virus Pox qui sont à symétrie hélicoïdale, et dont l'extraction de l'acide nucléique imbriqué à la gangue protéique ne se fait pas sans détérioration. On pouvait se demander si la lyophilisation ne faisait pas éclater le virion en libérant l'acide nucléique.

Nous avons tenté de cerner le problème de trois façons : Premièrement, en éliminant les ribonucléases avant la lyophilisation. Deuxièmement, en comparant les titres infectieux du produit lyophilisé traité ou non par la ribonucléase, celle-ci étant sans action sur le virus complet ; troisièmement, en préparant les cellules utilisées pour le titrage par un lavage préalable avec une solution 0,4 M de sulfate de magnesium.

Elimination des ribonucléases par la trypsine avant lyophilisation

Dans les procédés de purification du poliovirus que nous avons déjà exposés, la trypsine intervient à un stade précoce; elle permet en effet de se débarrasser des ribonucléases qui proviennent des cellules ou de leurs déchets. HOLLAND, LEROY MAC LAREN et SYVERTON (46) (47) d'une part, ALEXANDER, KOCH,

MOUNTAIN et SPRUNT (1) (2), d'autre part, ont montré que la chymotrypsine administrée à la dose de I00 µg/ml pendant 1 à 2 minutes, n'a pas d'action sur l'acide ribonucléique. La technique que nous avons suivi est celle de Chany (communication verbale).

On prépare d'abord les solutions suivantes : - trypsine purifiée "Choay" cristallisée 10 mg en solution de Earle sans calcium et sans magnesium, q.s.I00 ml - -Polypeptide cristallisé inhibiteur de polypeptidase à 200.000 U.I/P/ml (Iniprol "Choay") 0.5 ml en solution de Earle sans calcium et sans magnesium, q.s.I00 ml. Les deux solutions sont stérilisées par filtration sur Seitz EKS.2. Afin de laisser à la trypsine toute son efficacité, le virus poliomyélitique utilisé pour cette expérience fut préparé sur cellules rénales de singe maintenues en milieu de Parker sans sérum. On met en présence à 37°C pendant trente minutes :

10 ml de suspension de virus poliomyélitique

1 ml de solution de trypsine.

L'action de la trypsine est ensuite neutralisée par 1 ml de la solution d'inhibiteur de polypeptidase déjà cité. Les titrages effectués avant lyophilisation montrent que la trypsine à la concentration adoptée n'entraîne qu'une perte modérée.

Avant action de la trypsine $10^{5.8}$.

Après action de la trypsine $10^{5.I}$.

Pour la lyophilisation, on ajoute un égal volume de milieu stabilisateur composé de I0 % de dextran et 10 % de glucose en eau distillée, avec le virus poliomyélitique trypsiné ou non. La lyophilisation est réalisée sur appareil USIFROID MS.I2. pendant un temps identique pour les deux séries.

Les titrages effectués montrent une baisse du titre infectieux après lyophilisation similaire dans les deux cas et égale à 2,5 logarithmes.

	Titre infectieux	
	Avant lyophilisation	Après lyophilisation
Virus non trypsiné aa dextran + glucose IO %	$10^{5.8}$	$10^{3.3}$.
Virus trypsiné aa dextran + glucose IO %	$10^{5.I}$	$IO^{2.6}$.

.. Action de la ribonucléase

La ribonucléase A d'origine pancréatique bovine, Sigma (Chemical c° de Saint-Louis U.S.A). est administrée à la concentration de 1.000 γ/ml pendant 15 minutes sous le volume de 0.I ml dans chaque tube de culture cellulaire préalablement rincé à deux reprises avec une solution de Earle sans calcium et sans magnesium. On compare alors les titres infectieux des virus lyophilisés, titrés en présence ou en l'absence de ribonucléase.

	Titre infectieux du virus lyophilisé	
	non traité à la ribonucléase	+ ribonucléase
Poliovirus aa glucose IOg dextran 10 g eau q.s.100 ml.	$10^{2.9}$	$10^{3.3}$.
Poliovirus intracellulaire aa lait écrémé "Oxoid" 5ml Eau q.s.IOO ml.	$10^{2.I}$	$10^{2.1}$
Poliovirus aa lactose IOg acide glutamique 0,07 g, Albumine 1 g, solution tamponnée phosphatée Q.S. 100 ml.	$10^{I.9}$	$IO^{I.9}$

...Action du décapage cellulaire par lavage préalable des cellules au sulfate de magnesium.

La multiplicité même des méthodes de titrages de l'acide ribonucléique du poliovirus est significative de la difficulté du problème.

Holland Mac Laren, Syverton (45) (46) lavent les cellules avec une solution de chlorure de sodium 0.5 M et font adsorber ensuite l'.A.R.N. pendant 15 minutes. C'est également la solution adoptée par Prinzie (84) avec une adsorption de 30mn. pour l'A.R.N.

Rouandeh (92) et Holland (47) ont préféré le sulfate de Magnesium à concentration 2 M.Wecker, Hummeler et Goetz (111) sans doute devant l'altération irréversible des cellules abaissent la concentration jusqu'à 1 M.

De Maes (communication verbale) et nous-mêmes dans les essais ci-dessous, nous sommes limités à 0.4 M que nous laissons agir pendant 20 minutes à température ambiante, après lavage préalable des cellules avec la solution Earle. On inocule alors la suspension virale elle-même laissée en contact pendant 30 minutes avant de compléter avec du milieu d'entretien. Nous avons ainsi réduit les altérations non spécifiques qui apparaissent dans les 24 heures et sont dues au choc des cellules sous l'effet de l'hypertonicité.

	Titre infectieux du virus lyophilisé	
	Cellules lavées au Earle	Cellules imprégnées de 50 4 Mg. 0.4 M.
Poliovirus en Eagle 5 % non purifié aa Lactobionate 6 % et Albumine 2 %(lyophilisé à 0°C.	$10^{4.I}$	$10^{4.3.}$
Poliovirus Sabin en Eagle sans sérum, non purifié aa Lactobionate 6% et albumine 2% (lyophilisé à 0°C)	$10^{4.3}$	$10^{4.1}$
Poliovirus Mahoney en Eagle sans sérum non purifié, aa lactobionate 6% Albumine 2 % (lyophilisé à 0°C)	$10^{4.I}$	$10^{3.7}$

Aucun des essais que nous avons relaté ne permet de supposer que la baisse du titre infectieux observé après lyophilisation est en relation avec une libération d'acide ribonucléique. Nous confirmons notre hypothèse, en comparant les résultats des auteurs sur la résistance de l'A.R.N. à la chaleur avec la résistance du virus lyophilisé. En effet, si on se réfère au travail de Holland, Mac Laren, Hoyer, et Syverton (48) et à ceux de Koch, Koenig et Alexander (52), on voit que l'acide ribonucléique débarrassé de sa gangue protéique est plus résistant à la chaleur que le virus poliomyélitique intact ; c'est ainsi qu'en une minute à 100°C la perte est de 50 % et n'atteint 95 % qu'en trois minutes. A basse température au contraire, l'A.R.N. serait plus fragile. Les titrages effectués sur du virus lyophilisé (supposé complet et infectieux), nous ont toujours montré qu'après une minute à 100°C, on ne retrouvait que le 1/1.000 environ du virus ayant résisté à la lyophilisation (5 expériences avec

milieux stabilisateurs comportant soit du Yestolate à 5%, soit le milieu "Tryptic soy", soit une solution de dextran et glucose à IO %, soit une solution de glutamate d'arginine à 6.25 % et de sorbitol à IO %). Le virus infectieux complet lyophilisé est donc beaucoup plus sensible à la chaleur que l'A.R.N., sans doute également par suite de la détérioration de la capside protéique.

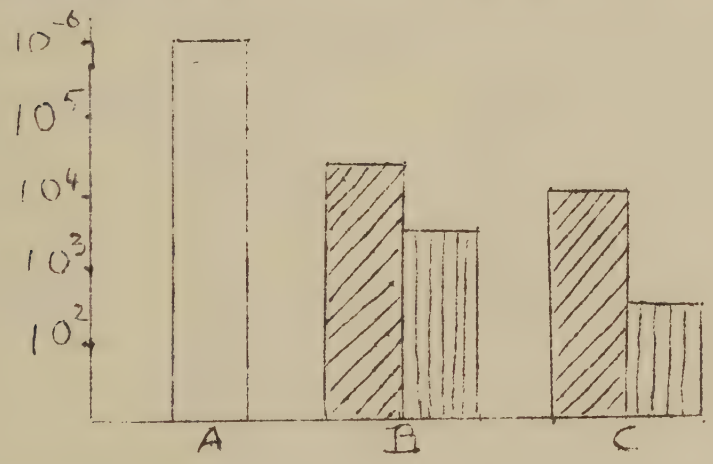
Lyophilisation du virus intra-cellulaire

Afin d'essayer de constituer artificiellement une enveloppe protectrice au virus poliomyélitique, nous avons inoculé des flacons de cellules Hela de 500 ml avec du virus poliomyélitique Sabin type I dilué à 1/500 soit au taux de I particule infectieuse pour 40 cellules environ. Après 45 minutes d'adsorption, nous avons lavé les cellules avec de la solution de Earle pour éliminer le virus non adsorbé, puis nous avons ajouté du milieu de Eagle à 5 % de sérum de veau. Le lendemain, soit 20 heures plus tard, le tapis cellulaire est lavé deux fois avec la solution de Earle pour éliminer le virus excrété dans le milieu ambiant ; après trypsination on récolte les cellules infectées, et par deux centrifugations à 3.500 tours suivie de reprise du culot avec du milieu de Eagle sans sérum, on élimine encore le virus extra-cellulaire.

La lyophilisation sur appareil MS.I2 (ampoules à température ambiante) nous a donné les résultats suivants.

	Titre infectieux avant lyophilisation	Titre infectieux après lyophilisation
Poliovirus intracellulaire lyophilisé en Eagle aa. Yestolate 5 % eau distillée.	$10^{6.3}$.	$10^{3.8}$
Poliovirus intracellulaire lyophilisé en Eagle aa lait écrémé "Oxoïd" à 5 % en eau distillée.	$10^{6.2}$	$10^{2.3}$.
Poliovirus intracellulaire lyophilisé avec du lait écrémé à IO %.	10^{7}	$10^{3.5}$.

De ces trois expériences, c'est encore le stabilisateur à base de Yestolate qui s'est montré le plus favorable.



Comparaison des résultats de lyophilisation de poliovirus extra ▨ ou intra-cellulaire ▥

A ▭ virus témoin non lyophilisé
B Virus lyophilisé aa Yestolate 5 %
C Virus lyophilisé aa lait écrémé IO %.

Lorsqu'après la remise en suspension avec de l'eau distillée à +4°C du virus lyophilisé, on centrifuge le produit pendant IO minutes à 4.600 tours par minute, on constate que le titre infectieux du surnageant du virus lyophilisé avec Yeastolate est de $IO^{3.25}$ et que celui du virus lyophilisé avec une quantité équivalente de lait à 5 % est de $10^{1.7}$.

La lyophilisation ou la remise en suspensinn fait donc éclater une grande partie des cellules infectées ; par ailleurs, le virus intra-cellulaire n'est pas plus résistant à la lyophilisation que le virus extra cellulaire traité de manière similaire.

Pour tenter d'empêcher cette rupture de la membrane cellulaire, nous avons repris nos expériences avec des cellules protégées par du glycérol ou du dimethylsulfoxyde.

Recherche de la concentration minima de glycérol ou de DMSO contenu dans le milieu de Eagle à 15 % et compatible avec la lyophilisation sur appareil Usifroid MS.I2.

Glycérol :	0.I %	produit sec après lyophilisation
	0.5 %	produit humide après lyophilisation
	1 %	produit humide après lyophilisation
	2 %	produit liquide après lyophilisation
	5 %	produit liquide après lyophilisation
DMSO	0.I %	produit sec après lyophilisation
	0.5 %	" " " "
	1 %	" " après décongélation initiale
	2 %	" " " "
	5 %	" " " "

Recherche de la concentration minima de glycérol de DMSO compatible avec la survie des cellules après congélation.

Les six millions de cellules Hela d'un flacon sont repris après trypsination avec 1 ml de milieu de Eagle contenant 10 % de sérum et des concentrations variées de glycérol ou

de diméthyl sulfoxyde. Après un séjour d'une nuit à + 4°C on adopte alors deux modes de congélations : soit directement à -70°C en bain marie contenant un mélange d'alcool et de glace carbonique, soit lentement à la cadence d'1°C par minute jusqu'à -70°C puis rapidement dans l'azote liquide. Le lendemain, on sort les ampoules de l'azote liquide et on les réchauffe brusquement dans un bain marie à + 40°C. Chaque ampoule est alors testée individuellement en ensemençant des flacons neufs en ajoutant du milieu de croissance comportant IO % de sérum et en suivant la multiplication cellulaire au cours des jours suivants.

Multiplication cellulaire après congélation

		congélation à -70°C	congélation 10°C/minute.
Glycérol	0.I %	0	0
	0.5 %	0	0
	1 %	0	+
	2 %	0	+
	5 %	0	+
DMSO	0.I %	0	0
	0.5 %	0	0
	2 %	0	+
	5 %	0	+

Essai de lyophilisation de cellules en glycérol ou DMSO

A ce stade de nos recherches, le problème paraît délicat tout au moins si on fait appel au glycérol ou au DMSO puisque, pour le glycérol la lyophilisation n'est possible que si la concentration est inférieure ou égale à 0.I % (à la rigueur 0.5 à I % pour un produit humide après lyophilisation) et que par ailleurs, il faut au moins I % de glycérol et un mode de congélation lent pour empêcher la mort des cellules au moment de la congélation. Avec le DMSO, la marge est moins étroite puisque la lyophilisation est possible avec des concentrations de DMSO atteignant 5 %, au prix il est vrai de décongélations

au début de la lyophilisation. Quoi qu'il en soit, tous les essais se sont soldés par des échecs que la reconstitution des cellules soit faite en eau distillée ou en solution glucosée à IO % en Earle ; les cellules Hela lyophilisées se sont toujours refusées à cultiver.

Essai de lyophilisation de virus polio Sabin intracellulaire

Malgré les résultats décevants obtenus quant à la lyophilisation des cellules, nous nous sommes demandés si des cellules même mortes ne seraient pas susceptibles de protéger le poliovirus vis à vis des effets de la lyophilisation.

Le poliovirus intracellulaire dont nous avons déjà exposé le mode de préparation est repris après lavage avec le milieu de Eagle à 5 % de sérum de veau puis additionné d'un volume égal de milieu de Eagle contenant 10 % de sérum de veau et des proportions variables de glycérol ou de DMSO.

Toutes les ampoules furent congelées lentement (I°C/minute) puisque cette vitesse était la plus favorable à la survie des cellules après congélation.

	Titre infectieux		
	avant lyophilisation	après lyophilisation	Surnageant après reconstitution
0.I% glycérol	$10^{4.5}$	$10^{2.5}$	$10^{0.85}$
0.5% glycérol	$10^{4.9}$	$10^{2.5}$.	$10^{1.27}$
0.I% DMSO	$10^{5.8}$	$10^{1.7}$	$10^{1.65}$
0.5% DMSO	$10^{5.9}$	$10^{1.7}$	10^{1}

Là encore, le glycérol et le DMSO à des concentrations compatibles avec la lyophilisation ont été incapables d'empêcher la rupture cellulaire et de protéger éventuellement le virus poliomyélitique intracellulaire.

IV - ETUDE DU MAINTIEN DES CARACTERES GENETIQUES ET DE L'ANTIGENICITE DU VIRUS LYOPHILISE

1) Marqueur génétique (rct 40)

Quelle que soit la perte de virulence engendrée par la lyophilisation, il faut savoir si le virus lyophilisé garde les mêmes caractères ou bien s'il est modifié. Pasteur n'a-t-pas atténué la souche de virus rabique des rues en desséchant les moelles à l'aide de potasse. Nous avons choisi pour le déterminer, le test thermique de LWOFF (rct 40) (62) qui est parmi les marqueurs génétiques un des plus constants. On dispose deux séries de titrage (2 tubes par dilution) dans une étuve à 36°C dans un bain marie de précision réglé à 40°C Pour ce test et afin que la lecture ne modifie pas la tempéra re d'indubation, on effectue une seule lecture au 5ème jour. souches virulentes ont des titres infectieux voisins aux deux températures, alors que les souches atténuées se développent mal à 40°C ; il y a alors 3 à 5 logarithmes d'écart entre les titrages réalisés aux deux températures.

Nous donnons ci-dessous les résultats des tests que nous avons effectués sur diverses suspensions de virus poliomyélitique atténué, ou sauvages et lyophilisées.

	Titre infectieux du produit lyophili et reconstitué en eau	
	Titre à 36°C	Titre à 40°C
Poliovirus Sabin aa Yestolate à 5 % en Earle	$10^{5.4}$	10^{1}
Poliovirus Sabin aa lait 20 ml glutamate IO g saccharose 2 g Milieu à l'hydrolysat de lactalbumine q.s.IOO ml.	$10^{3.7}$	10^{1}
Poliovirus Sabin aa dextran 4 g glutamate IO g Milieu à l'hydrolysat de lactalbumine q.s.IOO ml.	$10^{4.8}$	$10^{1.5}$
Poliovirus Sabin aa Sérum de poulain 15 ml glutamate 10 g saccharose 2 g Milieu à l'hydrolysat de lactalbumine q.s.IOO ml.	$10^{4.4}$	10^{1}
Poliovirus Mahoney en milieu de Parker + 5% de sérum de veau	$10^{4.45}$	$10^{4.4}$.

Si on s'en tient au marqueur thermique de LWOFF, nous pouvons conclure que la lyophilisation n'a pas modifié ce caractère génétique qui est une des caractéristiques de l'atté nuation de la souche de poliovirus de Sabin.

En titrant parallèlement le virus poliomyélitique Mahoney (souche sauvage) à 37°C et à 40°C, nous n'observons aucune différence dans les titrages ; la lyophilisation n'a donc aucune influence sur le marqueur génétique thermique qu'il s'agisse de souches atténuées ou de souches sauvages.

2) Sélection de particules résistantes à la dessication :

Bien que la souche Sabin ait été clonée au départ, des mutations ont pu se produire au cours de multiples passages effectués depuis.

En pratiquant deux lyophilisations successives, nous montrons qu'au cours de la dessication, une sélection s'est opérée : trois heures après le début de la lyophilisation, le virus est reconstitué avec de l'eau distillée et lyophilisé une deuxième fois ; les résultats suivants montrent nettement que la perte subie la deuxième fois est bien moindre que la première :

Poliovirus cultivé en milieu de Eagle 5 % non lyophilisé..$10^{6.8}$

Poliovirus Sabin lyophilisé pendant 6 heures.....$10^{3.5}$

Poliovirus Sabin lyophilisé pendant 3 heures, reconstitué puis à nouveau lyophilisé pendant 3 heures.....$10^{3.1}$

Cette sélection n'est pas génétique car, après un seul passage en culture cellulaire et nouvelle lyophilisation, la perte du titre infectieux est à nouveau de l'ordre de trois logarithmes. Cette sélection est moins nette, encore que significative si on raccourcit le temps de lyophilisation.

Poliovirus Sabin non purifié aa Yestolate 5 % en Earle non lyophilisé	$10^{5.43}$
Poliovirus Sabin non purifié lyophilisé pendant 3 heures	$10^{3.62}$
Poliovirus lyophilisé pendant 1h.30 reconstitué puis à nouveau lyophilisé pendant 1 h.30	$10^{2.56}$

3) Pouvoir antigénique :

POLLARD dans son étude publiée en 1951, signale que la baisse du pouvoir antigénique est parallèle à la baisse de virulence. N'ayant pas à cette époque la possibilité de démontrer ce fait sur les cultures cellulaires c'est par inoculation au singe qu'il le prouve.

NAGEL, DEKKER, HOFMAN et COHEN (68) tentent de stabiliser le vaccin antipoliomyélitique inactivé grâce à la lyophilisation. Ils utilisent pour ce faire un stabilisateur à base de peptone et de sorbitol. L'antigénicité du vaccin lyophilisé est testée par inoculation de poulets de trois semaines. Leur test montre que la perte d'antigénicité n'est pas considérable pour le type I, variant de 30 à 66 %; elle est plus importante pour le type 2, (50 à 72 %) ; quant au type 3, elle atteint IOO %. La thermostabilité à 45°C serait en revanche meilleure pour le vaccin lyophilisé que pour le vaccin frais. La lyophilisation est donc capable dans une certaine mesure de conserver l'antigénicité du virus poliomyélitique inactivé, autrement dit indépendamment de toute virulence.

Nous avons pour notre part, comparé à plusieurs reprises la baisse du titre infectieux du produit lyophilisé avec celle du titre antigénique. Le propre d'un antigène étant de provoquer chez l'animal la formation d'anticorps, c'est habituellement en titrant les anticorps ainsi formés chez l'animal qu'on détermine le pouvoir antigénique. Pour dissocier le pouvoir infectieux et le pouvoir antigénique, nous avons tenté de saturer un sérum de faible titre avec une suspension de poliovirus lyophilisé dont la dilution ultérieure est choisie pour être non infectieuse. Le titrage proprement dit est fait tantôt à sérum constant et à antigène variable, tantôt à sérum variable et à antigène constant.

<u>Premier essai</u> :

Du poliovirus additionné à partie égale de lait (20 ml), glutamate (10g), saccharose (2 g) en milieu à l'hydrolysat de lactalbumine % est lyophilisé ; le titre infectieux avant lyophilisation est de $10^{6.7}$ et après lyophilisation de $10^{3.2}$.

On dilue la suspension virale lyophilisée et reconstituée à 1/46.775 pour obtenir 100 D.C.T.50 théoriques (sans tenir compte de la baisse du titre infectieux). A cette dilution, il n'y a plus d'infectiosité puisque le titre du virus lyophilisé n'est que de $10^{3.2}$.

Le problème consiste donc à savoir si ces 100 D.C.T.50 théoriques, qui correspondent en réalité à du virus tué par la lyophilisation, sont antigéniques ou non, autrement dit si elles sont encore capables de saturer des anticorps d'un sérum.

On incube pendant 1 heure à 37° C le mélange de ces 100 D.C.T.50 théoriques avec un volume égal de sérum de poulain ayant un faible titre d'anticorps au 1/I6 contre le type 1 de poliovirus.

Au bout de ce temps, on reprend ce sérum adsorbé et on titre les anticorps résiduels en effectuant une séroneutralisation à : sérum constant et à virus variable. Pour ce faire, un même volume de sérum adsorbé est additionné de suspension virale dont le titre va de 10^3 à 10^7 et on incube à nouveau à 37°C pendant 1 heure avant d'inoculer une série de tubes de culture cellulaire. On titre parallèlement les anticorps de sérum non adsorbé en déterminant le titre du poliovirus après séroneutralisation vis à vis des mêmes suspensions de poliovirus de 10^3 à 10^7.

Les résultats sont les suivants :

Poliovirus + sérum adsorbé : D C T 50 = $10^{5,5}$

Poliovirus + sérum non adsorbé D C T 50 = $10^{5,4}$

La similitude des titres infectieux observés indique qu'il n'y a pas eu de saturation des anticorps du sérum de poulain par les 100 D CT 50 théoriques du poliovirus lyophilisé et que par conséquent la baisse du pouvoir infectieux s'est bien accompagnée d'une perte d'antigénicité

Deuxième essai :

Le poliovirus cultivé en milieu de Earle à 5 % est additionné à partie égale d'une solution de lactobionate de calcium à 6 % et d'albumine bovine à 2 % puis lyophilisé.
1) On inocule quatre cobayes par voie intrapéritonéale avec 0,25 ml seulement de poliovirus Sabin purifié non lyophilisé dont le titre infectieux est de $10^{7.25}$ D C T 50. On prélève le sang par voie cardiaque 19 jours plus tard et on effectue ensuite un titrage des anticorps en mettant en présence les dilutions de sérum inactivé à 56° C pendant 30 minutes, avec 100 D C T 50 de poliovirus Sabin pendant 1 heure à 37°C puis une nuit à + 4°C. On inocule alors les tubes de cellules Hela et on détermine après 5 et 7 jours le nombre de tubes dont les cellules sont altérées par ce poliovirus.

	Titre des sérums	
	avant inoculation	après inoculation
Sérum n° 1	< 1/4	1/500
Sérum n° 2	< 1/4	> 1/500
Sérum n°3	< 1/4	1/500
Sérum n° 4	< 1/4	> 1/500

II) On inocule par voie intrapéritonéale trois cobayes avec 0,50 ml de poliovirus Sabin lyophilisé. On prélève le sang au 19ème jour et on pratique une séroneutralisation des sérums en présence de 100 D C T 50 de poliovirus Sabin comme pour les sérums des bobayes ayant reçu le poliovirus non lyophilisé.

	Titre des sérums	
	avant inoculation	après inoculation
Sérum n° 5	< 1/4	< 1/IO
Sérum n° 6	< 1/4	< 1/IO
Sérum n° 7	< 1/4	< 1/IO

III) Deux cobayes sont laissés non inoculés dans la même cage que ceux qui ont reçu le virus lyophilisé. Les tests au 1er jour et au 19ème jour montrent l'absence d'anticorps ou un taux inférieur à 1/10.

Bien que le titre infectieux du poliovirus Sabin lyophilisé en lactobionate 6 % et albumine 2 % ne soit que de $10^{2,25}$, on aurait pu penser que le pouvoir antigénique serait conservé. En réalité les taux d'anticorps ci-dessus montrent clairement que l'antigénicité a été détruite aussi fortement que l'infectiosité.

Troisième essai :

Du poliovirus Sabin cultivé en milieu de Eagle contenant 5 % de sérum est dialysé contre de l'eau, puis lyophilisé. Le titre avant lyophilisation est de 10^5 et après lyophilisation inférieur à 1.

On inocule deux séries de 13 cobayes, l'une avec le poliovirus avant lyophilisation, l'autre avec le poliovirus après lyophilisation. Dans chaque série, six cobayes sont inoculés par voie sous cutanée avec 0,5 ml du virus dilué au 1/5 et 7 cobayes avec le virus dilué au 1/50.

Dix neuf jours plus tard, on prélève du sang de chacun des cobayes par ponction cardiaque, et, après inactivation du sérum à 56°C pendant 30 minutes, on effectue une séroneutralisation en engageant une centaine de D C T 50 pour le virus (67 pour le 1er titrage et 166 pour le 2ème titrage) et en ne testant les sérums de cobayes qu'à la dilution du 1/4. Le mélange de chaque sérum est laissé en contact pendant 4 h 30 à 37°C en bain marie puis pendant 1 nuit à + 4°C, après quoi on inocule deux tubes de culture de cellules Hela par mélange de virus + sérum. La sensibilité de la réaction est vérifiée en engageant un sérum témoin de référence n° 1.I746 titrant 1/5.000 que nous devons à l'obligeance du Professeur Sohier.

On examine les tubes inoculés, au 4ème et au 7ème jour pour déterminer les lésions cytopathogènes, puis par la méthode de Reed et Muench, on détermine le taux de conversion pour le poliovirus avant et après lyophilisation. Dans le cas présent, on trouve : $>1,69$ pour le poliovirus non lyophilisé

$<0,69$, pour le poliovirus lyophilisé

Quatrième essai :

Du poliovirus Sabin cultivé en milieu de Eagle contenant 5 % de sérum est dialysé contre de l'eau puis additionné, avant lyophilisation, d'un volume égal de "Yestolate" à 10 % en eau distillée. Le titre avant lyophilisation est de $10^{5,09}$ et après lyophilisation de $10^{2,8}$.

On inocule le virus non lyophilisé à une série de 10 cobayes (5 avec le poliovirus dilué à 1/5, et 5 avec le virus dilué au 1/50). Le virus lyophilisé dilué à 1/5 et à 1/50 est inoculé à 11 cobayes en tout. Les animaux sont tous saignés au dix neuvième jour et on effectue la séroneutralisation comme dans le 3ème essai.

Les taux de conversion que nous avons trouvés cette fois sont les suivants :

1,53 pour le poliovirus non lyophilisé

$<0,69$ pour le poliovirus lyophilisé

Nous pouvons donc conclure que dans les [illegible] expériences relatées ci-dessus la baisse d'antigénicité accompagne la baisse du pouvoir infectieux. Ceci rejoint les conclusions que POLLARD avait obtenu en travaillant sur singes. Puisque le virus déprotéiné subit une perte au même titre que le virus total, et puisque l'antigénicité est aussi atteinte, nous pouvons penser que la lyophilisation altère non seulement l'ARN mais aussi la capside.

V - CONSERVATION DANS LE TEMPS DU VIRUS LYOPHILISÉ.

JUsqu'à présent, nous n'avons étudié que la perte virale immédiatement après la lyophilisation ou après conservation à - 30° C des ampoules lyophilisées. Or l'intérêt de la lyophilisation n'est pas de conserver les ampoules de poliovirus lyophilisé à une aussi basse température (d'ailleurs parfaitement bien tolérée par le virus en phase liquide) d'où l'étude de la résistance du produit à des températures plus élevées en fonction du temps.

a) Virus poliomyélitique aa "Yestolate" à 5 % en Earle à pH 5,6 durée 7 heures :

(appareil à lyophiliser USIFROID MS.I2 (type hérisson)

Titre après lyophilisation $10^{6,2}$	100°C	37°C	20°C
5 minutes	$10^{2,8}$		
1 semaine		$10^{3,7}$	
2 semaines		$10^{2,7}$	$10^{5,87}$
4 semaines			$10^{5,20}$

Période de 1/2 vie = 11 jours.

à + 20°C VOIR TABLEAU 1.

b) Virus poliomyélitique + "Yestolate à 5 % en Earle à pH.7,2, lyophilisation, durée : 2Ih.45.

(appareil USIFROID M S J (type chambre)

Titre après lyophilisation 10^5	37°C	20°C	4°C
1 semaine	10^3		
2 semaines		$10^{4.6}$	
4 semaines		$10^{3.7}$	
6 semaines		$10^{2.9}$	
8 semaines		$10^{1,62}$	
12 semaines			$10^{4.2}$
18 mois			10^2

Période de 1/2 vie à + 20°C = 11 jours.

Période de 1/2 vie à + 20°C = 11 jours.

L'alignement des points trouvés à 20°C transposés sur une courbe log.dose, la température tend à montrer que la dégradation suit une réaction du premier ordre.

VOIR TABLEAU II

c) Virus poliomyélitique aa, lait 20 ml, glutamate 10 g, saccharose 2 g, milieu hydrolysat de lactalbumine q.s.100ml - lyophilisation sur appareil USIFROID en chambre M.S.J. effectuée sous la direction du Professeur REY, durée : 36 heures.

	37°C	20°C
Titre après lyophilisation $10^{3.3}$		
1 jour	$10^{3.3}$	
1 semaine	10^{1}	
2 semaines		$10^{2.7}$
4 semaines		$10^{1.4}$

Période de ½ vie à + 20°C = 6 jours.

durée : 60 heures :

	37°C	20°C
Titre après lyophilisation $10^{3.3.}$		
1 jour	$10^{3.3.}$	
1 semaine	10^{1}	
2 semaines		$10^{2.24}$
4 semaines		$10^{1.27}$

Période de ½ vie à + 20°C = 5 jours.

La prolongation de la dessication n'augmente donc pas la perte comme nous l'avons déjà signalé ; elle n'améliore pas non plus sensiblement les conditions de conservation du virus.

d) Virus poliomyélitique aa glutamate 10 g, dextran 4 g en milieu à l'hydrolysat de lactalbumine q.s.100 ml - lyophilisation sur appareil USIFROID en chambre M.S.J. effectuée sous la direction du Professeur REY :

durée : 19 h.30 :

Titre après lyophilisation $10^{4.9}$

	37°C.	20°C
1 semaine	$<10^3$	
4 semaines		$<10^3$

Période de ½ vie à + 20°C ≠≠ 1 jour.

e) Virus poliomyélitique aa, sérum de poulain non inactivé à 56°C, 15 ml, glutamate 10 g, saccharose 2 g, en milieu à 1l hydrolysat de lactalbumine.q.s.100 ml - lyophilisation sur appareil USIFROID en chambre M.S.J. effectuée sous la direction du Professeur REY.

durée : 26 h I5.

Titre après lyophilisation $10^{4,4}$	37°C	20°C
1 semaine	10^1	
2 semaines		$10^{3.23}$

4 semaines (période de demi-vie à + 20°C = 2 jours.

f) Virus poliomyélitique aa, sérum poulain contenant 0.I % cystine (mélange incubé 18 heures à 37°C avant lyophilisation sur appareil MS.I2)

Titre après lyophilisation $10^{5.I6}$	37°C	20°C
" " 7 jours	$10^{I.5}$	
" " I4 jours		$10^{2.05}$
" " 28 jours		$10^{1.16}$

Période de demi-vie à + 20°C = 0,5 jours.

g) Virus poliomyélitique aa, Yestolate à 5% en Earle contenant 0.I % cystine (mélange incubé 18 heures à 37°C avant lyophilisation sur appareil MS.I2)

Titre après lyophilisation $10^{3.26}$	37°C	20°C
" " 7 jours	$10^{1.5}$	
" " 14 jours		$10^{2.56}$
" " 28 jours		$10^{I.62}$

Période de demi-vie à + 20°C = 7 jours.

L'évolution du titre infectieux au cours de la conservation du poliovirus lyophilisé en présence de divers stabilisateurs montre que malgré la dessication, le poliovirus reste fragile. A + 4°C, température généralement adoptée pour la conservation des produits lyophilisés, le titre infectieux du poliovirus baisse de près d'un logarithme en trois mois. A 20°C, c'est en 3 à 4 semaines que le titre infectieux baisse d'un logarithme. A 37°C une chute importante est observée en qualques jours. Comme Greiff et Rightsel le signalent (43) l'avantage de la lyophilisation n'est pas de fournir un produit stable à toutes températures, mais seulement à des températures de conservation ou de transport plus commode que celle supportée par le virus non lyophilisé ; autrement dit, la lyophilisation n'offre d'intérêt que si le virus desséché est devenu plus stable qu'en phase liquide.

Or, le virus poliomyélitique à l'état frais, stabilisé par le procédé de MELNICK (I06) au chlorure de magnésium à concentration molaire ne perd qu'un logarithme en 15 jours à température ambiante. Le saccharose à 50 % (33) est également un stabilisateur commode pour conserver le vaccin poliomyélitique pendant 6 mois à + 4°C.

Nos propres expériences faites avec la glycérine tamponnée ajoutée comme stabilisateur à volume égal au poliovirus non lyophilisé montre une baisse minime et régulière du virus.

Titre de départ $10^{6.6}$	20°C	4°C
1 semaine	$10^{5.8}$	
2 semaines	$10^{5.8}$	$10^{6.25}$
2 mois		$10^{6.I6}$

Période de demi-vie à + 20°C : 3 jours.

A ce sujet, et bien que la dégradation subie par le virus poliomyélitique lyophilisé soit du même ordre de grandeur que celle du virus rougeoleux (43), il ne semble pas que la

lyophilisation du poliovirus présente un intérêt pratique puisqu'avec tous les stabilisateurs essayés, on a observé une baisse de titre infectieux importante immédiatement après la lyophilisation et que cette diminution s'est poursuivie au cours de la conservation à un rythme voisin de celui du poliovirus stabilisé à l'état liquide. C'est l'objet de cette dernière partie de voir si par un autre procédé on pourrait résoudre le problème.

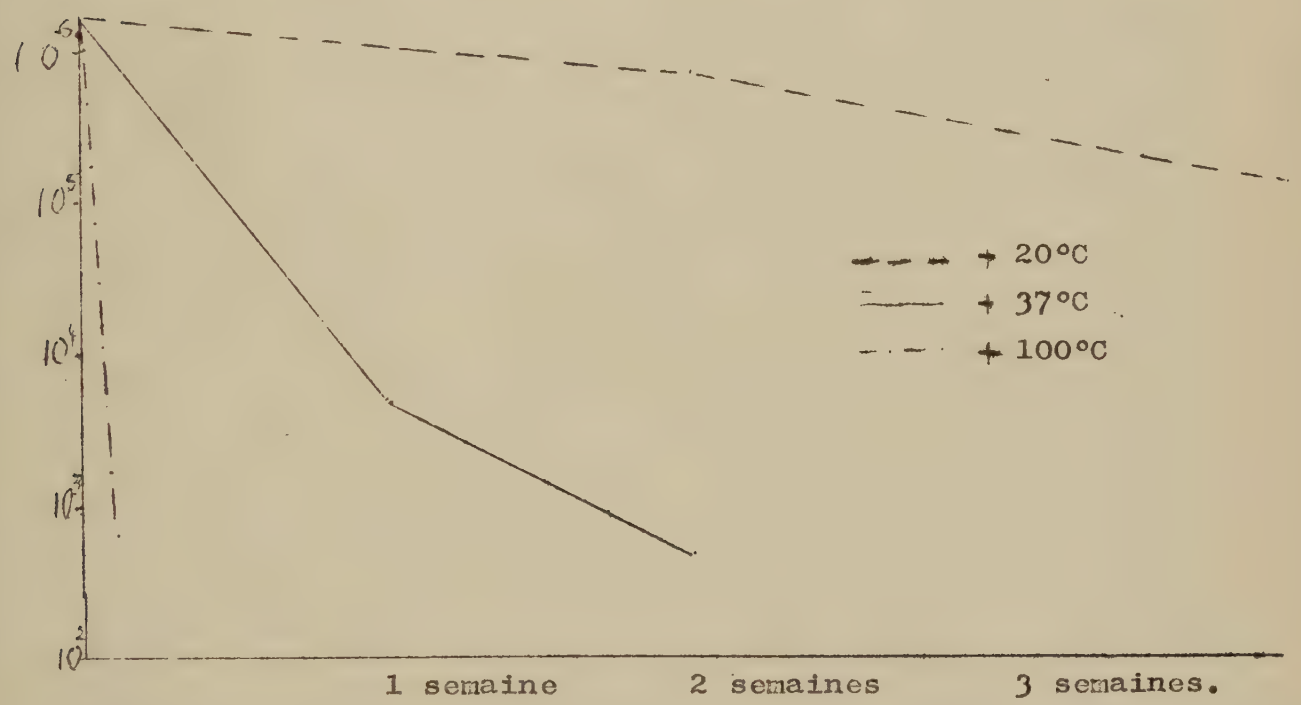


Tableau I : Conservation à différentes températures du poliovirus lyophilisé (aa Yestolate à 5%) sur appareil USIFROID MS.I2.

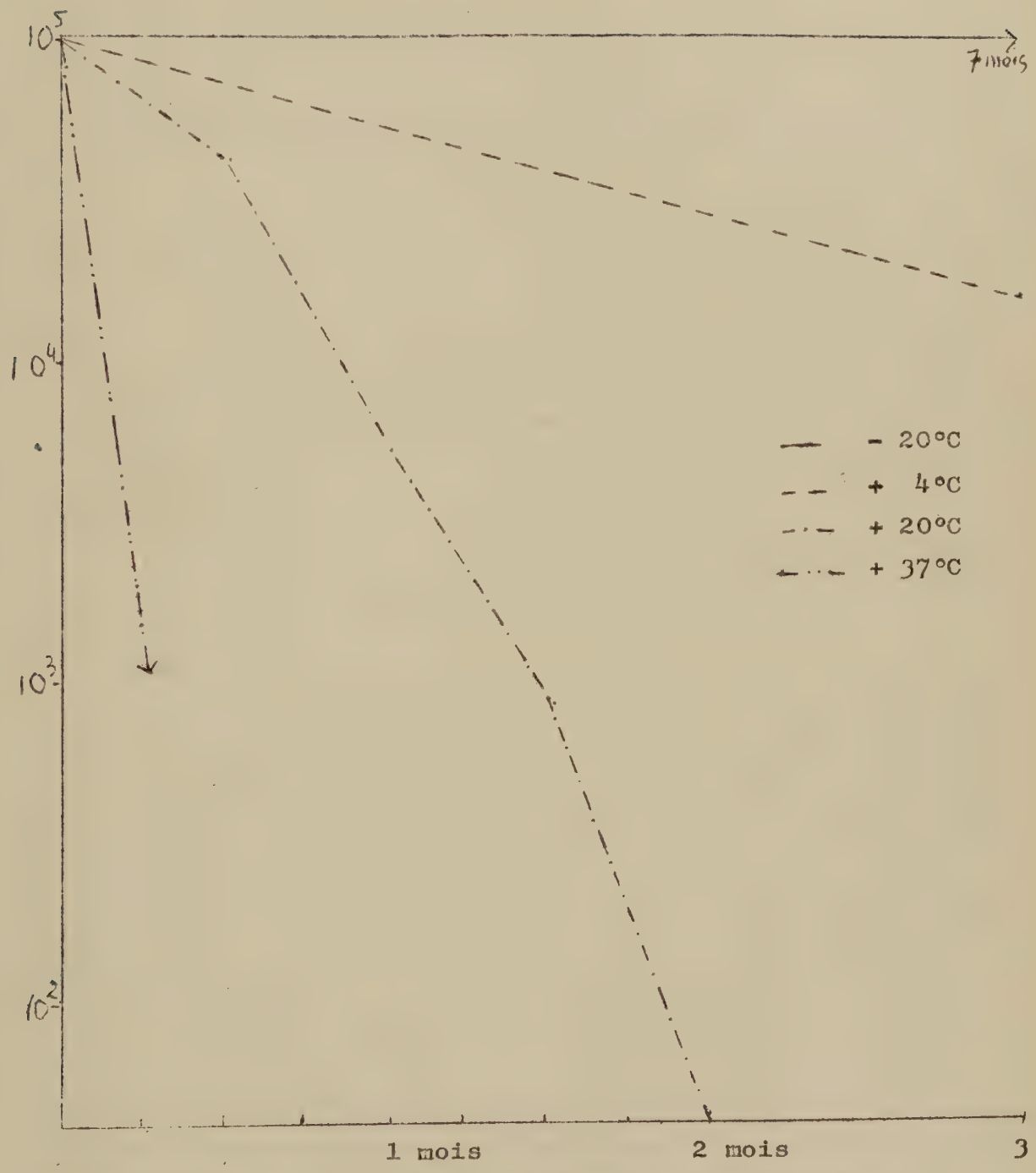


TABLEAU II : Conservation à différentes températures du poliovirus lyophilisé. aa Yestolate à 5 % sur appareil Usifroid MSJ.

VI - ESSAIS DE LYOPHILISATION DU POLIOVIRUS EN MILIEU NON AQUEUX.

Il s'agit là d'un procédé tout nouveau imaginé et mis au point par le Professeur REY (88) et par Mademoiselle DOUSSET (22). Il présente l'avantage de permettre la lyophilisation de produits liposolubles et de pouvoir travailler à plus basse température qu'en milieu aqueux pour autant que le solvant puisse être solidifié par refroidissement et qu'à l'état solide la tension de vapeur reste suffisante pour en permettre l'extraction sous un vide modéré et dans un délai raisonnable.

L'application à la virologie de cette nouvelle technique n'a jamais encore été faite ; elle pose un grand nombre de problèmes nouveaux que nous avons tenté de résoudre.

1) Le matériel :

Nous avons fait tous les travaux préliminaires avec un appareil USIFROID MS.I2 mais, pour éviter que les vapeurs de solvant n'aillent contaminer l'huile de la pompe à vide, le condenseur fut refroidi à une température très basse en remplaçant le mélange de neige carbonique et d'alcool par de l'azote liquide. Un deuxième condenseur à azote liquide fut ajouté lors de nos premières expériences ; plus tard, nous nous sommes contentés d'empêcher un départ trop brutal du solvant, qui risquerait de contaminer l'huile de la pompe, en allongeant d'environ 20 cm le circuit de vide entre les ampoules et le condenseur. Afin de prévenir un réchauffement trop rapide du produit congelé, les ampoules du produit à lyophiliser furent immergées dans un bain marie à + 4°C. Plus tard, nous avons utilisé un bain marie thermostaté.

2) Les solvants :

Nous avons étudié les possibilités d'emploi des divers stabilisateurs déjà utilisés par d'autres (88) (22) ; sans préjuger de l'action toxique éventuelle de ces solvants, nous devons d'abord rappeler leurs propriétés physiques et les températures probables de lyophilisation telles qu'elles ont été édictées par REY (88) et DOUSSET (22).

	Température d'ébullition 760 mm H g	Température de fusion 760 mm H g	Température probable de lyophilisation.
Chloroforme	6I.I5	-63	-85 à-6I°C
Diethylamine	55,2	-50	-90 à-55°C
Tetra chlorure de Carbone	76.75	-22,99	-80 à -35°C
Benzène	80.I0	+ 5.53	-60 à -20°C
Dioxanne	101,5	+11,7	-80 à -20°C

Avec les différents solvants étudiés, (dioxanne, diethylamine, benzène, chloroforme, tétrachlorure de carbone), nous n'avons jamais eu besoin de vidanger l'huile de la pompe.

L'utilisation de solvant non aqueux pose maintenant un deuxième problème, à savoir son innocuité pour les virus que l'on désire justement stabiliser.

- Les effets antiseptiques de l'alcool sont bien connus
- La résistance des entérovirus à l'éther et au chloroforme est une propriété fondamentale de ce groupe de virus, qui peut s'expliquer par l'absence de lipoprotéine dans sa constitution. D'autres facteurs entrent sans doute en jeu car une publication récente (11) fait état de la sensibilité du poliovirus au toluène qui est variable selon que la souche est du type sauvage ou atténué. La souche Sabin de type 1 y est en effet moins sensible, que les souches sauvages.

- Les effets virulicides éventuels des solvants non aqueux utilisés dans cette étude ont du être recherchés, la littérature étant muette à leur sujet.
- L'emploi de substance de charge nous a posé un problème supplémentaire; en effet, sans modifier les conditions de la lyophilisation ou altérer le produit, ces substances doivent empêcher l'entraînement du virus lors d'une sublimation trop brutale ; elles sont donc bien nécessaires, mais elles obligent à reconstituer le produit après lyophilisation avec des solvants non aqueux qui ne sont pas dénués de toxicité pour les cellules utilisées pour titrer les virus. Ces dernières en effet ont des membranes lipoprotéiniques qui sont sensibles aux solvants lipidiques.

L'appréciation du pouvoir virulicide éventuel peut se faire car il existe un décalage suffisant entre la dilution qu'il faut effectuer pour titrer le virus et celle qui est cytotoxique. En revanche, le titre infectieux du virus ayant baissé sensiblement après la lyophilisation, les deux taux de dilution se rapprochent, et il est souvent nécessaire d'effectuer des subcultures pour différencier ce qui est toxique de ce qui est viral.

2) <u>Le virus</u> :

Certains solvants non aqueux sont miscibles à l'eau, c'est le cas du dioxanne ou de la diethylamine ; d'autres ne le sont que très faiblement (chloroforme) ; le benzène et le tétrachlorure de carbone ne sont pas miscibles.
- Les solvants miscibles à l'eau seraient d'un emploi commode en virologie, car les virus se multiplient sur des cultures cellulaires dont le milieu d'entretien est en phase aqueuse. Avec le dioxanne ou la diethylamine il suffit de mélanger la suspension virale aqueuse avec le produit.

- Les solvants peu ou non miscibles nécessitent une préparation du virus que l'on peut concevoir de deux façons :

a) filtration sur membrane dont la porosité est fonction du virus à étudier ; séchage terminal par aspiration prolongée de gaz stérile puis reprise du dépôt à la spatule, élution, ou solubilisation de la totalité de la membrane. La reprise du dépôt, à l'aide d'une spatule n'est pas un procédé très reproductible et l'élution introduit un facteur de dilution qui n'est pas souhaitable ; quant à la dissolution de la membrane filtrante, les solvants non aqueux utilisables sont toxiques pour le poliovirus; le citrate de sodium à 3.7 % qui dissout facilement les membranes d'alginate et n'est pas toxique pour le poliovirus, est un solvant aqueux qui ne répond donc pas aux caractéristiques souhaitées.

b) Centrifugation

La suspension virale est centrifugée à 40.000 tours pendant 45 minutes sur Centrifugeuse "Spinco" refroidie; le surnageant est éliminé par égouttage, la galette de virus est plus compacte si on ajoute avant la centrifugation, un peu de gélatine comme Baron (12) l'a montré. On reprend le culot avec un volume de solvant non aqueux additionné de substance de charge correspondant au volume de la suspension avant centrifugation. L'émulsion produite empêche d'apprécier le moment où la remise en suspension est complète d'où la faiblesse de certains titrages ; lorsque la remise en suspension est correctement effectuée avec de nombreux pipetages, on peut admettre que la perte virale est faible de l'ordre de la moitié.

Les pots à centrifuger, faits de cellulose transparente sont attaqués par le dioxanne ou la diethylamine ce qui oblige à utiliser des pots opaques en polyallomère. Malgré cette complication, car il est toujours difficile de reprendre complètement le culot dans un tube opaque, malgré le manque de

régularité du taux de récupération du poliovirus centrifugé, c'est finalement ce procédé que nous avons adopté pour les solvants non miscibles.

4) La remise en suspension après lyophilisation :

Lorsque le solvant utilisé pour la lyophilisation est miscible à l'eau, la remise en suspension est facile avec de l'eau distillée.

Par contre, si le solvant ou si les substances de charge ne sont pas miscibles à l'eau, la remise en suspension avec de l'eau entraîne la formation d'une émulsion adhérente aux parois et instable dont le titrage est imprécis. La remise en suspension avec un solvant non aqueux n'est guère praticable non plus, car pour faire les titrages en culture cellulaire, les dilutions doivent se faire en phase aqueuse.

Nous avons parfois utilisé le Tween 80 à 1 % qui diminue l'importance de l'émulsion sans la faire disparaître complètement.

5) Résultats :

- Diethylamine :

Il s'agit d'un solvant non aqueux, miscible à l'eau en toutes proportions.

- Pouvoir Virulicide

Les deux formules de stabilisateur que nous avons étudiées, présentaient un pouvoir virulicide considérable après 30 minutes de contact à + 4°C. In vivo chez la souris inoculée avec les dilutions successives d'un mélange constitué à partie égale de diethylamine et d'un broyat à 10 % de tissu cérébral de souris morte après inoculation de virus de la fièvre jaune (souche Rockefeller I7.D), on a observé une diminution de trois logarithmes de la dose létale 50 %.

In vivo sur cellules Hela, on a observé les titres infectieux suivants pour le poliovirus :

(Poliovirus Sabin I (Diethylamine (Maltose	0,10 ml 0,85 ml 0,05 g	$10^{2.5}$.
(Poliovirus Sabin I (Solution de Earle	0,10 ml 0,90 ml	$10^{7.4}$
(Poliovirus Sabin I (Diethylamine (Maltose	0,50 ml 0,45 ml 0,05 g	$10^{2.5}$.
(Poliovirus Sabin I (Solution de Earle	0,50 ml 0,50 ml	$10^{7.4}$.

-- Toxicité cellulaire :

La D C T 50 de la diethylamine est pour les cellules Hela de l'ordre de $10^{3.5}$, si bien que le pouvoir virulicide joint à une cytotoxicité rendant difficile l'appréciation du titre infectieux, nous ont fait abandonner rapidement l'étude de ce produit.

- Le Dioxanne (R.P.)

C'est un solvant non aqueux miscible à l'eau en toutes proportions.

- Pouvoir virulicide :

In vivo : Le mélange à partie égale de Dioxanne et d'un broyat à 10 % de cerveau de souris mortes de Fièvre jaune (souche Rockefeller 17 D) est laissé en contact pendant 30 minutes à + 4°C avant de réaliser des dilutions et de les inoculer à des lots de 5 souris. Le Dioxanne a réduit la D L 50 de trois logarithmes.

La même expérience est reprise avec le virus aphteux type A ; la baisse de la D L 50 par rapport aux témoins est de l'ordre d'un logarithme. La parenté entre le virus aphteux

et le poliovirus qui appartiennent l'un et l'autre aux "Picornavirus" nous fit escompter que le poliovirus ne serait pas trop détérioré par le dioxanne.

In vitro : Nous avons recherché sur cellule Hela le pouvoir virulicide éventuel de plusieurs formules de stabilisateur pour le poliovirus. Afin d'apprécier par la même occasion l'action conjuguée de la congélation (temps préliminaire à toute lyophilisation) nos titrages furent réalisés systématiquement avant et après congélation.

Titre infectieux du poliovirus additionné ou non de dioxanne.

	Sans Dioxanne	Avec Dioxanne	
		non congelé	décongelé
Dioxanne 0.85 ml Maltose 0,05 g Poliovirus non purifié 0,10 ml.	$10^{7.4}$	$10^{6.6}$	10^{6}

Titre infectieux du poliovirus additionné ou non de dioxanne

	Sans Dioxanne	Avec Dioxanne	
		non congelé	décongelé
Dioxanne : 0,45 ml Maltose 0,05 g Poliovirus non purifié : 0,50 ml.	$10^{7.4}$	10^{7}	$10^{6.5}$
Dioxanne : 4,9 ml. Polystyrène : 0,1 g Poliovirus non purifié : 5 ml.	$10^{7.5}$	$10^{6.8}$	$10^{6.I}$
Dioxanne : 4,5 ml. Cholesterine 0,5g. Poliovirus non purifié : 5 ml.	$10^{6.8}$	$10^{6.6}$	$10^{6.8}$
Dioxanne : 4,5 ml. Monostéarate de glycérol 0,5 g Poliovirus non purifié : 5 ml.	$10^{6.8}$	$10^{6.8}$	$10^{6.4.}$
Dioxanne : 4,5 ml. Ac.palmitique 0,50g Poliovirus non purifié 5 ml.	10^{7}	$10^{6.8}$	$10^{6.4.}$
Dioxanne : 4,75 ml. Céphaline : 0,25 g Poliovirus non purifié : 5 ml.	$10^{5.5}$	$10^{5.6}$	$10^{5.3}$
Dioxanne : 4,75 ml. Acide palmitique 0.25g Poliovirus non purifié 5 ml.	$10^{6.6}$	$10^{6.I}$	$10^{6.4.}$

Ces tests préliminaires confirment le léger pouvoir virulicide trouvé après 30 minutes de contact à + 4° C pour presque toutes les associations ; il existe en outre, une différence de 0,38 log. en moyenne entre les résultats des titrages effectués avant et après décongélation sans que l'on puisse imputer cette action néfaste à la congélation (obligatoire pour la lyophilisation) ou à la décongélation (inexistante dans une lyophilisation bien réglée). Cette toxicité du dioxanne légère lorsque le temps de contact est réduit devient plus importante si on conserve le virus poliomyélitique en contact même à -30°C pendant plusieurs jours comme en font foi les expériences suivantes :

Dioxanne	4 ml
Maltose	0,6 g
Dextran	0,1 g : 0,5 ml + 0,5 ml de virus poliomyélitique Sabin I.
Glycérol	0,1 ml
Saccharose	0,2 g

Titre du virus poliomyélitique Témoin $10^{5.5.}$
Titre du virus après mélange $10^{5.2.}$
Titre du mélange conservé 3 jours à -30°C : $10^{4.5.}$

Poliovirus dialysé	0,25 ml
Yestolate à 5 % en eau	0,50 ml
Dioxanne	0,25 ml

Titre du virus poliomyélitique témoin $10^{5.3}$
Titre du virus aussitôt après le mélange $10^{5.16}$
Titre du mélange conservé 20 jours à -30°C $10^{3.83}$

-- Toxicité cellulaire :

La D C T 50 du dioxanne dilué en milieu d'entretien de Eagle à 5 % est pour les cellules Hela de $10^{2.5}$. Elle permet

donc d'effectuer des titrages du pouvoir infectieux après lyophilisation d'autant que la majeure partie de dioxanne est éliminée à ce stade.

-- La lyophilisation :

La courbe d'analyse thermique du Dioxanne pur ne montre pas d'accident pendant le réchauffement (22). Toutefois, celle du Dioxanne additionné de 75 % à 87,5 % de milieu de Eagle à 5 % de sérum de veau que nous devons à l'obligeance de Monsieur LEFEVRE du Centre d'Etude Cryogénique de l'Air liquide à Sassenage, montre plusieurs accidents à -28°C et vers -40°C.

Le point de fusion du produit qui est habituellement de 11°C, est abaissé à 6°C en présence de 1 % de polystyrène (22). La sublimation débute à -80°C, mais elle reste encore intense entre -40 et -25°C (22). Nous avons adopté pour nos propres expériences tantôt l'appareil à lyophiliser USIFROID, type MS I2, tantôt l'appareil en verre mis au point par le Professeur REY et décrit par Mademoiselle DOUSSET (22) tantôt l'appareil adapté au bain marie thermostaté de l'Air liquide ; il nous fut possible de suivre la lyophilisation grâce à la sonde thermique qui se trouve dans le produit lui-même et permet un enregistrement continu de la température.;Le condenseur secondaire qui surplombe la chambre de lyophilisation ou le bain marie thermostaté ont permis au contraire de diriger les opérations.

<u>Etude de différentes proportions de poliovirus et de dioxanne</u> :

La température de -30°C a été maintenue dans le produit pendant 3 heures, puis on a laissé le réchauffement se produire seul pendant 3 heures 30 supplémentaires ; à ce moment, la température du produit était de + I2°C. Les résultats suivants montrent une chute importante du titre du virus quelle que soit la proportion de dioxanne :

	Titre infectieux avant lyophilisation	Titre infectieux appès lyophilisation
Poliovirus non purifié : 0,75 ml. Dioxanne 0,25 ml.	$10^{6.5}$	10^{4}
Poliovirus non purifié : 0,4 ml. Dioxanne 0,6 ml	$10^{6.5}$	$10^{2.6}$
Poliovirus non purifié : 0,25 ml. Dioxanne : 0,75 ml.	$10^{6.5}$	$10^{2.5}$
Poliovirus non purifié : 0,10 ml Dioxanne 0,90 ml.	$10^{6.5}$	$10^{3.I}$

Etude de quelques substances de charge :

Compte tenu des résultats observés avec des stabilisateurs en phase aqueuse, et de ceux obtenus avec le dioxanne seul, nous considérons que, pour être intéressante, une substance de charge devrait réduire le titre infectieux après lyophilisation à moins de deux logarithmes.

Un grand nombre d'essais fut réalisé avec des lipides ou des glucides, il faut bien dire que la confection de ces stabilisateurs est délicate car il faut que le produit soit suffisamment broyé ou dissout, sans toutefois que le Dioxanne ne ne soit trop volatilisé ; certains résultats discordants que nous n'avons jamais pu reproduire ensuite sont peut être dus à ce facteur.

		Titre infectieux avant lyophilisation	Titre infectieux après lyophilisation
Dioxanne ac.palmitique Poliovirus non purifié	4,5 ml 0,5 g 5 ml.	$10^{6.4}$	$\leqslant 10^{3.7}$
Dioxanne ac.palmitique Poliovirus	4,75 ml 0,25 g 5 ml.	$10^{6.6}$	$\leqslant 10^{3.7}$
Dioxanne Monostérate de glycérol Poliovirus non purifié	4,5 ml. 0,5 g 5 ml.	$10^{5.6}$	$\leqslant 10^{3.7}$
Dioxanne Cholesterine Poliovirus non purifié	4,5 ml. 0,5 g. 5 ml.	$10^{5.6}$	$\leqslant 10^{3.7}$
Dioxanne Maltose Poliovirus non purifié	8,5 ml 0,5 g 5 ml.	$10^{6.5}$	$10^{3.7}$
Dioxanne Maltose Poliovirus non purifié	4,5 ml. 0,5 g. 5 ml.	$10^{6.6}$	$10^{4.6}$
Dioxanne Maltose Dextran Glycérol Saccharose Poliovirus non purifié	0,4 ml) 0,6 g) 0,1 g) 0,1 ml) 0,20 g)) 1 volume.	9 volumes. $10^{5.3}$	$\leqslant 10^{1}$

	Titre infectieux avant lyophilisation	Titre infectieux après lyophilisation
Dioxanne 8 ml) Maltose 0,6g) 9 volumes Dextran 0,1g) Glycérol 0,1ml) Saccharose 0,2g) Poliovirus non purifié) 1 volume.	$10^{5.8}$	$\leqslant 10^{1}$
Dioxanne 4 ml. Maltose 0,6 g Dextran 0,1 g Glycérol 0,1 ml. Saccharose 0,2 g Poliovirus non purifié aa.	10^{5}	$10^{-0.8}$
Dioxanne 4 ml. Maltose 0,6 g Dextran 0,3 g Glycérol 0,1 g Saccharose 0,3 g Poliovirus non purifié aa.	$10^{4.3}$ (conservé à -30°C)	$\leqslant 10^{1}$
Dioxanne 0,45 ml) Maltose 0,05 g) 0.3 Extrait embryonnaire de poulet :0,20 Poliovirus non purifié 0,50 ml.	$10^{6.3}$	$10^{2.8}$
Dextran 3 g Glucose 3 g: 0.20 ml. Eau q.s. 30 ml. Dioxanne 0.30 ml Poliovirus non purifié : 0.50 ml.	10^{6}	$10^{I.2}$
Dioxanne 0.30 ml. Lait écrémé 0.20 ml Poliovirus Sabin non purifié : 0.50 ml.	$10^{5.5.}$	$10^{2.05}$

		Titre infectieux	
		Avant lyophilisation	Après lyophilisation
Yestolate à IO % en eau	0,45 ml		
Dioxanne	0,45 ml.	$10^{6.9}$	$<10^{3.5}$
Poliovirus	0,10 ml.		
Lactobionate de Ca 2 g)			
Albumine bovine 2 g)	0.45ml.		
Milieu de Parker à 2%)			
de sérum q.s.IOO ml)			
Dioxanne	0.45ml.	$10^{6.9}$	10^{4}
Poliovirus	0.IOml.		

Pour les deux formules de dioxanne + maltose + virus poliomyélitique, la comparaison de deux modes de congélation (lente dans un congélateur à -65°C en culot, ou plus rapidement, en coquille, en faisant tourner les ampoules dans un bain d'azote liquide) n'a pas montré de différence sensible du titre infectieux après lyophilisation.

Influence de la température :

Nous avons utilisé, l'appareil en verre du Professeur REY qui permet d'effectuer des lyophilisations à très basse température mais en l'absence de système de régulation automatique, nous n'avons pu maintenir la température à un taux précis. Le plus souvent donc, après un certain temps de surveillance, nous avons laissé le produit se réchauffer lentement. Avec le bain thermostaté de l'Air liquide, nous avons pu maintenir la température avec précision, mais l'absence de sonde thermique ne nous a pas permis de connaître la température exacte du produit. Un schéma rassemble en fin de paragraphe, l'ensemble des résultats.

. Expérience sans injection de gaz

	Durée Lyophilisation	Volume	Titre infectieux avant lyophilisation	Titre infectieux après lyophilisation.	Aspect
/-60°C/					
Poliovirus non purifié aa-Dioxanne	6 heures	0,5ml.	$10^{6.5}$	$10^{6.25}$	Sirupeux
Poliovirus non purifié: 0.50ml. lactobionate de Ca 2 g Albumine 2 g Parker q.s. 100 ml. Dioxanne	Réchauffement en 17 heures + 30°C. → +30°C 0.25 ml 0.25 ml.	0.5 ml	$10^{6.9}$	10^{4}	sec
Poliovirus non purifié 0.50 ml Yestolate à 5 % en eau Dioxanne	durée id 0.25 ml. 0.25 ml.	0.5 ml	$10^{6.9}$	$<10^{3.5}$	sec
/- 40°C/					
Poliovirus non purifié aa Dioxanne	6heures	0.5ml.	$10^{6.5}$	$10^{3.75}$	non sec
/- 35°C/					
Poliovirus non purifié: 0.25 ml. Dioxanne : 0.25 ml. Yestolate : à 10 % eau 0.50ml.	8heures puis réchauffement en 15 heures + 10°C.	1 ml.	$10^{4.5}$	$<10^{1}$	sec

	Durée lyophilisation	Volume	Titre infectieux avant lyophilisation.	Titre infectieux après lyophilisation.	Aspect
- 30°C					
Poliovirus non purifié aa Dioxanne	6 heures	0.5ml	$10^{6.5}$	$10^{4.25}$	non sec
- 25°C					
Poliovirus non purifié 0.75ml. Dioxanne : 0.25ml.	19heures	0.5ml	10^{6}	$10^{2.5}$	sec
0°C					
Poliovirus non purifié 0,1 ml/ Dioxanne : 0.9 ml.	3 heures	0.5 ml.	10^{7}	$<10^{4}$	sec
Poliovirus non purifié: 0.75ml. Dioxanne : 0.25 ml.	5 heures	0.5 ml.	$10^{7.25}$	10^{5}	sec

- Le mode de congélation en culot à -65°C ou en coquille par rotation des ampoules dans l'azote liquide n'a pas modifié le résultat final.

- A basse température la lyophilisation en milieu aqueux est très laborieuse compte tenu de la faible tension de vapeur d'eau. Avec le Dioxanne pur dont la tension est plus élevée, elle est réalisable. Le problème consiste donc à trouver une

proportion de dioxanne et de poliovirus qui permette la dessication à basse température sans nuire au titre infectieux du virus lyophilisé, puisque toute dilution du poliovirus, avant lyophilisation tend à réduire le titre après lyophilisation, plus fortement que la simple dilution ne le laisserait prévoir. Les différents essais pratiqués montrent que la proportion favorable de dioxanne pour la lyophilisation à très basse température est de 90 %. A -30°C, les mesures de pression en cours de lyophilisation montrent que l'évaporation ne se produit bien que pour 60 à 90 % de dioxanne, le volume du produit à lyophiliser doit être réduit aux alentours de 0.I ml, mais bien que le produit lyophilisé ne soit pas sec, le titre infectieux fut abaissé de 2 à 5 logarithmes.

- Le virus plus ou moins desséché par la lyophilisation est très sensible à l'épreuve thermique à 50°C pendant une heure, c'est ainsi que le titre infectieux du poliovirus lyophilisé à - 60°C, - 40°C, - 30°C a diminué de 1.000 à 100.000 fois. Pour mémoire, le simple chlorure de magnesium à concentration molaire (106) stabilise le poliovirus en phase liquide à la même température et sans perte de titre.

.. <u>Expérience avec injection de gaz inerte (azote R)</u>.

Comme pour nos essais en solvants aqueux, nous avons tenté d'accélérer la lyophilisation ou de réduire le choc dû à une dépression trop importante sur le virus, en injectant de l'azote R, au cours de lyophilisations effectuées au bain marie thermostaté à basse température en s'efforçant de maintenir la pression aux alentours de 5 X 10^2 mm de Hg.

	durée	volume	Titre infectieux avant lyoph.	Titre infectieux après lyoph.	aspect
/- 50°C/					
Poliovirus non purifié 0.4ml. Dioxanne 0.6ml.	2 heures puis réchauffement en 6 heures → + 10°C	0.5ml	$10^{7.3}$	$\leqslant 10^{3.5}$	non sec
Poliovirus non purifié 0.25ml. Dioxanne 0.75ml.	"	0.35ml.	$10^{7.3}$	$\leqslant 10^{3.5}$	non sec
Poliovirus non purifié 0.10 ml. Dioxanne 0.90ml.	"	0.5 ml.	$10^{7.3}$	$10^{3.75}$	sec
Poliovirus non purifié 0.10 ml. Dioxanne 0.90ml.	6 heures puis réchauffement en 2h.30 → - 6°C	0.5 ml.	$10^{7.1}$	$10^{4.3}$	sec
Poliovirus non purifié o.10 ml. Dioxanne 0.85ml. Maltose 0,05 g	"	0.5 ml.	$10^{6.9}$	$10^{3.5}$	sec
/- 35°C/					
Poliovirus non purifié 0.75ml. Dioxanne 0.25ml.	18h30 (bain-marie)	0.5 ml.	$10^{6.6}$	$10^{2.75}$	sec
/- 30°C/					
Poliovirus non purifié 0.75ml. Dioxanne 0.25ml.	19 h. (bain marie)	0.5 ml.	$10^{6.25}$	$10^{1.35}$	sec

	durée	volume	Titre infectieux avant lyoph.	après lyoph.	aspect
Poliovirus non purifié: 0.4 ml. Dioxanne : 0.6 ml.	3 heures puis réchauffement en 3 h.30 12°C.	0.5ml.	$10^{6.5}$.	$\leqslant 10^{2.5}$	sec
Poliovirus non purifié: 0.25ml. Dioxanne : 0.75 ml.	"	0.5 ml.	$10^{6.5}$	$\leqslant 10^{2.5}$.	sec
Poliovirus non purifié 0.10ml. Dioxanne : 0.90ml.	"	0.5ml.	$10^{6.5}$	$\leqslant 10^{2.5}$.	sec
/-25°C/					
POliovirus non purifié 0.75 ml. Dioxanne 0.25 ml.	18 h. (bain-marie)	0.5ml.	10^{4}	10^{1}	sec
/-15°C/					
POliovirus non purifié 0.75 ml. Dioxanne : 0.25 ml.	19 h. (bain - marie)	0.5ml.	$10^{4.5}$	$\leqslant 10^{2.5}$	sec
/-20°C/					
Gazage Air 95 % CO^2 5 %	4h30 (bain-marie)	0.5ml.	$10^{5.5}$	$\leqslant 10^{0.75}$	sec
Poliovirus non purifié aa					

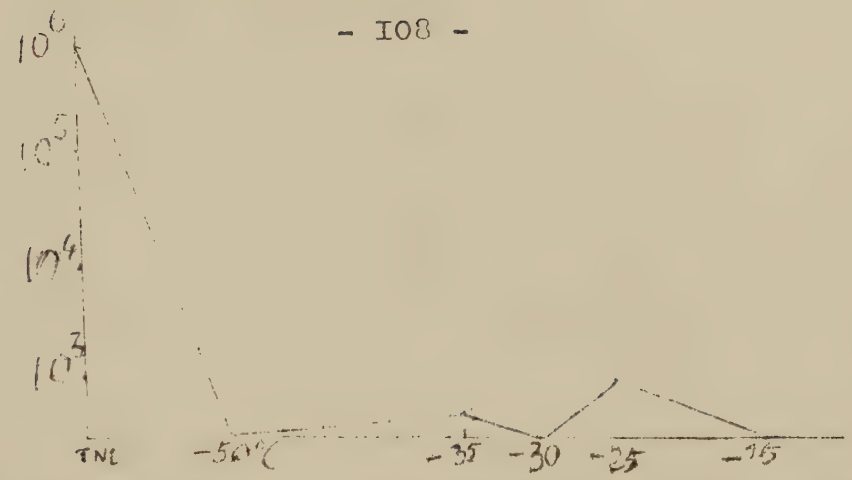


Schéma résumant les titres infectieux observés après lyophilisation à basse température et injection continue d'azote (T.NL.= témoin non lyophilisé).

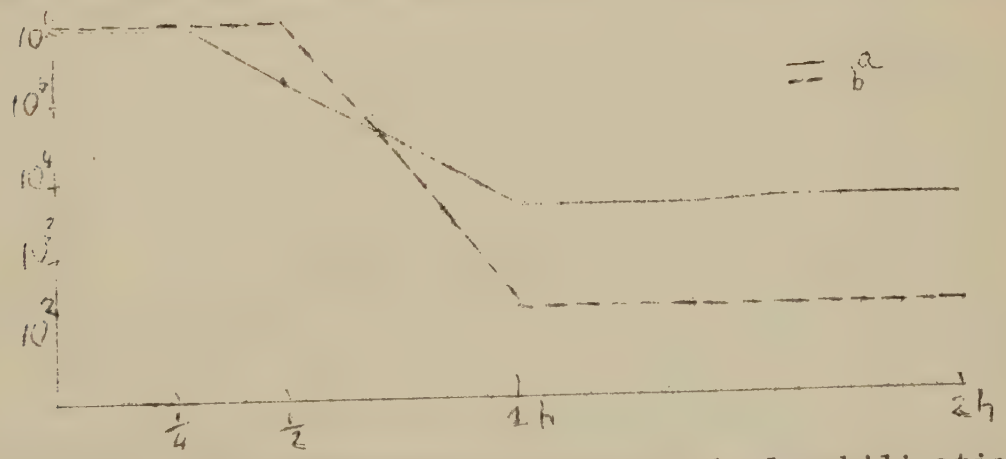
Etude cinétique :

Deux expériences furent réalisées sur appareil USIFROID MC.I2 pour voir si la diminution du titre infectieux se produisait dès le départ ou ultérieurement. Les suspensions virales avaient la composition suivante :

a) Dioxanne 0.25 ml.
Poliovirus 0.75 ml.

b) Dioxanne 0.45
Maltose 0.05
Poliovirus 0.50

Les résultats sont rapportés dans le graphique suivant :



Evolution du titre infectieux au cours de la lyophilisation.

Dans le cas présent, il semble que la baisse du titre infectieux soit légèrement retardée par rapport à ce que nous avions noté pour la lyophilisation effectuée en milieu aqueux, vraisemblablement parce que durant cette phase préliminaire, seul le dioxanne, substance très volatile est éliminée ; la stabilisation obtenue en 1 heure indique que la dessication est obtenue rapidement.

Aucun des essais pratiqués avec le Dioxanne, ne nous a permis quelles que soient les conditions de travail d'obtenir une baisse du titre infectieux inférieure à 2 logarithmes après lyophilisation.

Le Benzène :

C'est un solvant non aqueux et non miscible à l'eau. Il est donc indispensable de commencer par centrifuger le poliovirus pendant 45 minutes à 45.000 tours pour éliminer toute la phase aqueuse surnageante; Le plus souvent d'ailleurs, la reprise du culot par la solution de benzène et de substance de charge aboutissait à la formation d'une émulsion que nous avons cherché à réduire par l'addition de 1 % de tween 80.

La toxicité cellulaire :

La D C T 50 pour les cellules Hela est de $10^{1.5}$, ce qui est faible sans doute par manque de contact entre les cellules et le benzène séparés l'un de l'autre par un film d'eau.

.. Le pouvoir virulicide :

Titre infectieux du poliovirus additionné ou non de benzène

	Sans Benzène	Avec Benzène		
		Non congelé		Décongelé
		sans Tween	+ Tween	
Benzène 9.2 ml. Ac.palmitique 0.75g Culot de 10 ml virus.	$10^{6.5}$	$10^{5.4}$	$10^{5.6}$	$10^{5.5}$.

Titre infectieux du poliovirus additionné ou non de benzène

	Sans benzène	Avec Benzène Non congelé		Décongelé
		sans Tween	+Tween	
Benzène 4.75 ml. Céphaline 0.25 g Culot de 5 ml. de virus.	$10^{6.3}$	$10^{5.I}$	$10^{5.I}$	$10^{5.I}$
Benzène 9.25 ml. Cholestérol 0.75 g. Culot de I0 ml. de virus.	10^{6}	$10^{5.8}$	$10^{4.5}$	$10^{4.8}$
Benzène 9.25 ml. Monostéarate de glycérol 0.75 g.	$10^{6.5}$	$10^{6.6}$	$10^{6.3}$	$10^{6.3}$
Benzène 9.25 ml. Polystyrène 0.I0g Culot de 10 ml. de virus	$10^{6.5}$	$10^{6.5}$	$10^{5.8}$	$10^{6.5}$

Pour le toluène, substance voisine, Balayan et Panosyan (11 ont observé après 30 minutes de contact à + 4°C, un léger pouvoir virulicide voisin d'un demi-logarithme.

Après 30 minutes de contact à température ambiante, nous avons constaté des variations du titre infectieux des suspensions de poliovirus additionnées de benzène. Le benzène lui-même ne semble pas devoir être incriminé mais plutôt les substances de charge ou les pertes lors de la centrifugation ou des titrages par suite d'adsorption sur les parois des tubes. L'emploi de Tween 80 pour effectuer les titrages n'a pas présenté d'avantage par rapport à la simple dilution en solution de Earle. La congélation fut sans effet sur le titre infectieux du poliovirus.

... La lyophilisation

Trois tentatives de lyophilisations furent réalisées pour apprécier l'intérêt éventuel d'un stabilisateur à base de benzène.

	Titre infectieux avant lyophilisation	Titre infectieux après lyophilisation
Benzène 9.25 ml. Monostéarate de glycérol 0.75 ml. Culot de 10 ml de virus.	$10^{6.3}$	$10^{2.9}$
Benzène 9.25 ml. Polystyrène 0.I0ml. Culot de I0 ml de virus.	$10^{6.5}$	$10^{3.5}$.
Benzène 4.75 ml. Lécithine 0.25 ml. Culot de 10 ml de virus	$10^{6.5}$	$10^{3.I}$

Compte tenu de l'obligation de centrifuger préalablement le poliovirus à grande vitesse, et de la baisse importante du titre infectieux après lyophilisation lors de ces expériences préliminaires, nous n'avons pas jugé utile de poursuivre ces essais.

Le Chloroforme :

Le chloroforme est un solvant non aqueux qui n'est miscible à l'eau qu'en très faible quantité d'où la nécessité comme pour le benzène de ne l'utiliser que pour reprendre le culot de centrifugation du poliovirus. Son point de fusion de -63°C à la pression atmosphérique oblige à lyophiliser vers -60°C à -80°C.

. La Toxicité cellulaire :

La D C T 50 sur cellules Hela est de $10^{2.5}$.

-- Le pouvoir virulicide :

Les divers résultats d'expérience énumérées ci-dessous démontrent une atteinte non négligeable du poliovirus.

	Titre infectieux du poliovirus additionné ou non de chloroforme.	
	sans chloroforme	avec chloroforme
Chloroforme 9.25ml. Cholestérol 0.75 g. Culot de 10 ml.de virus	$10^{6.6}$	$<10^{4.5}$
Chloroforme 9.25 ml. Acide palmitique 0.75 ml. Culot de 10 ml. de virus.	$10^{6.6}$	$10^{5.3}$
Chloroforme 9.25 ml. Monostéarate de glycérol 0.75 g. Culot de IO ml. de virus.	$10^{6.6}$	$10^{4.8}$
Chloroforme 9 ml. Polystyrène O.I ml. Culot de IO ml. de virus	$10^{7.3}$	$10^{5.I}$

Devant ces résultats, nous n'avons pas jugé utile de lyophiliser le poliovirus additionné de chloroforme et de substances de charge, la baisse du titre infectieux étant déjà trop importante, avant toute dessication;

Le Tétrachlorure de carbone :

C'est un solvant non aqueux, non miscible à l'eau, Sa température de fusion qui est de -23°C à la pression atmosphérique permet de lyophiliser entre -35°C et -80°C.

. La toxicité cellulaire :

La D C T 50 sur cellules Hela est de $10^{2.5}$

.. Le pouvoir virulicide :

L'atteinte du pouvoir infectieux est relativement faible sauf, (comme pour le benzène) lorsque la substance de charge comporte de l'acide palmitique ou de la céphaline.

	Titre infectieux du poliovirus additionné ou non de Cl^4			
	Sans CCl^4	Avec CCl^4		
		non congélé		Décongelé
		Sans Tween	+Tween.	
CCl^4 9,9 Polystyrène 0,1 Culot de 10 ml. de virus.	$10^{7.5}$	$10^{7.5}$	$10^{7.5}$	$10^{7.5}$
CCl^4 9.25ml. Monostéarate de glycérol 0.75 ml. Culot de IO ml de virus.	$10^{5.8}$	$10^{6.4}$	$10^{5.I}$	$10^{5.I}$
CCl^4 9.25 ml. Cholestérol 0.75 ml. Culot de 10 ml de virus.	$10^{7.5}$	$10^{7.I}$	$10^{6.9}$	$10^{7.4}$
CCl^4 9.25 ml. Acide palmitique 0.75. Culot de 10 ml.de virus.	$10^{7.5}$	$10^{5.3}$	$10^{4.3}$	$10^{5.}$
CCl^4 4.75 ml. Céphaline 0.25 ml. Culot de 5 ml. de virus.	$10^{6.3}$	$10^{4.8}$	$10^{4.8}$	NT

... Lyophilisation.

Deux essais de lyophilisation sont tentés pour apprécier les résultats:

	TITRE INFECTIEUX	
	avant lyophilisation	après lyophilisation
CCl^4 9.25 ml. monostéarate de glycérol 0.75 ml. Culot de IO ml. de virus.	$10^{5.83}$	$< IO^2$
CCl^4 9.25 ml. Cholestérol 0.75 g. Culot de IO ml. de virus.	$10^{4.42}$	$< 10^2$

Il ressort de tous ces essais que la lyophilisation du poliovirus en milieu non aqueux ne peut se faire le plus souvent qu'au prix d'une complication supplémentaire sans apporter en revanche d'avantages quant à la survivance du virus.

Fusion -32°C.

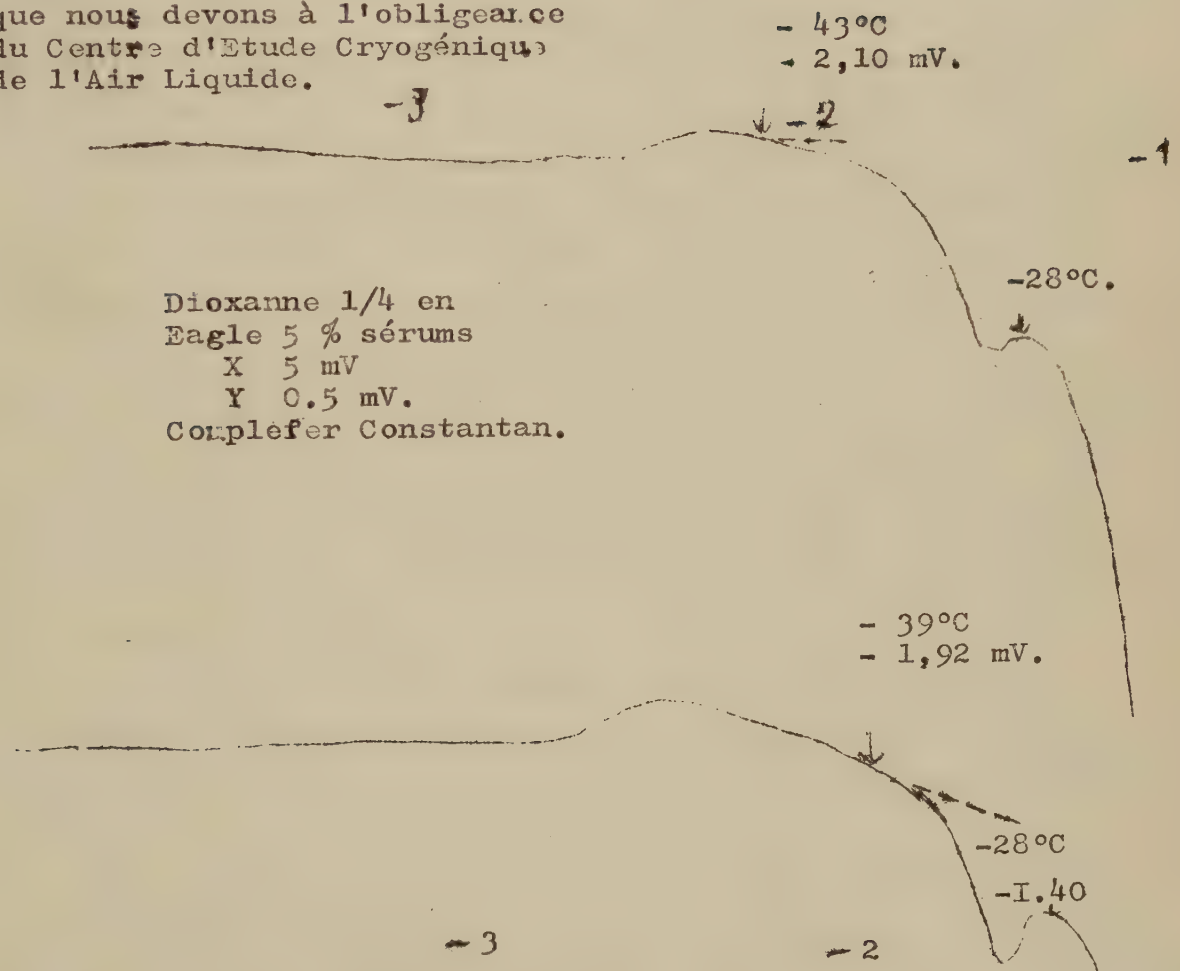
-758 mV

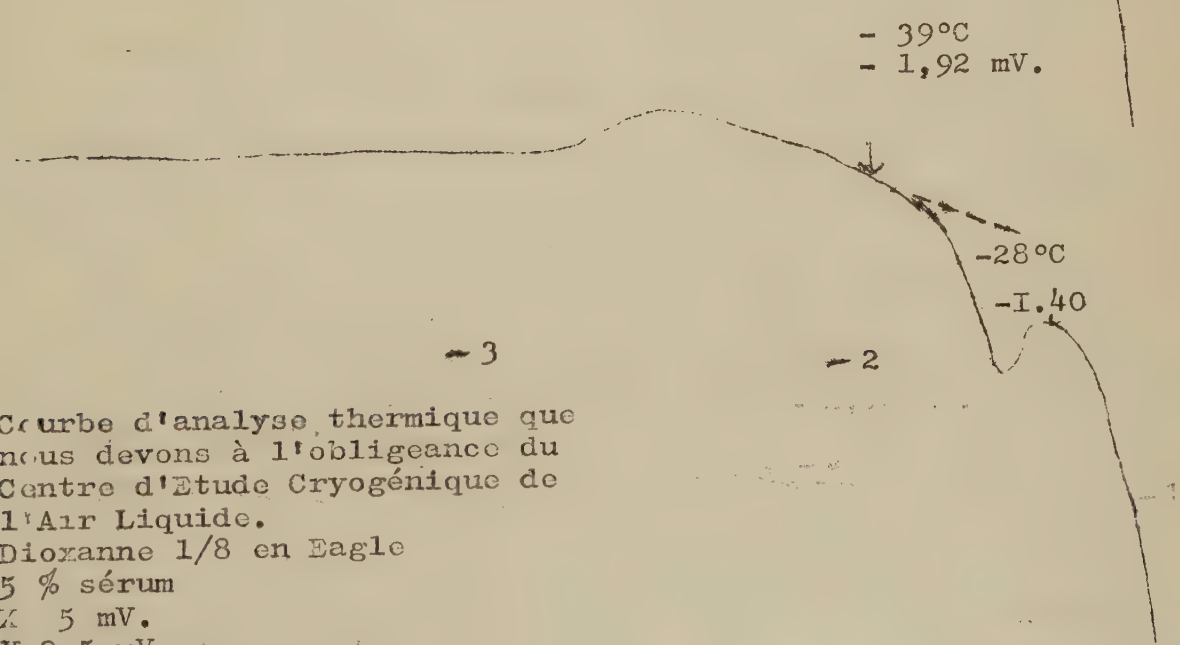
-3 -2 -1

Courbe d'analyse thermique que nous devons à l'obligeance du Centre d'Etude Cryogénique de l'Air Liquide.

Eagle 5 % sérum veau
aa Yestolate en Earle
Sens X 5 mV
Y 0,5mV
Couple FerConstantan.

Courbe d'analyse thermique
que nous devons à l'obligeance
du Centre d'Etude Cryogénique
de l'Air Liquide.





Courbe d'analyse thermique que
nous devons à l'obligeance du
Centre d'Etude Cryogénique de
l'Air Liquide.
Dioxanne 1/8 en Eagle
5 % sérum
X 5 mV.
Y 0.5 mV.
Coupléfer Constantan.

CONCLUSIONS

L'étude de la structure des virus ne laisse pas encore prévoir formellement le résultat de la lyophilisation. Ni le type d'acide nucléique (A.R.N. ou A.D.N.), ni le mode de symétrie (cubique ou hélicoïdale) ne permettent en effet de séparer les virus dont la baisse du titre infectieux est importante au cours de la lyophilisation de ceux pour lesquels cette diminution est négligeable. Il n'existe dans la littérature que des renseignements succints ou contradictoires sur les virus dépourvus d'enveloppe et de lipides essentiels (Papovavirus, Adénovirus, Picornavirus) ; parmi les picornavirus l'accord est unanime sur les entérovirus humains (poliovirus, Coxsackie virus, Echovirus) qui ne peuvent être lyophilisés qu'au prix d'une perte importante du titre infectieux ; les rhinovirus se scinderaient en deux catégories (sensible et résistante) mais le seul travail paru dans la littérature mérite confirmation et il en est de même des études sur le virus aphteux.

Le choix d'un virus réputé "difficile"à lyophiliser" permettait l'étude approfondie d'un certain nombre de paramètres susceptibles d'influer sur les résultats de la lyophilisation.

Les Conclusions de nos recherches sont les suivantes :

- En l'absence de milieu stabilisateur, la baisse du titre infectieux consécutive à la lyophilisation du poliovirus type I atténué (Sabin) ou sauvage (Mahoney) est supérieure à 2,3 logarithmes décimaux. Le virus purifié par dialyse,chromatographie ou centrifugation à grande vitesse est encore plus sensible et la baisse du titre infectieux varie de 3,2 à 4,5 logarithmes décimaux. Cet écart de sensibilité entre le virus "brut" et le virus "purifié" tient au fait que le milieu de croissance des

virus comporte un certain nombre de substances glucidiques et protidiques capables de jouer un rôle protecteur.

- Parmi les diverses substances que nous avons essayées pour tenter de stabiliser le poliovirus, le lait, le sérum, la gélatine et l'extrait de levure "Yestolate" ont permis de diminuer l'effet néfaste de la lyophilisation, le titre infectieux ne baissant que de 1 à 1,7 logarithmes ; au contraire, parmi les substances glucidiques, seul le dextran à chaîne longue nous a permis d'atteindre ce résultat. L'addition de chlorhydrate de cystine et l'incubation à 35° C pendant 20 heures, renforce l'action protectrice du sérum de poulain sur le poliovirus, mais la baisse du titre infectieux reste encore supérieure à 1 logarithme. Le thioglycolate destiné à maintenir un état d'anaérobiose n'a manifesté aucune action bénéfique.

- Le poliovirus atténué ou sauvage résiste bien à la congélation, qu'elle soit effectuée à plus ou moins grande vitesse. Les vitesses de congélation que nous avons utilisées furent cependant habituellement modérées. La diminution du titre infectieux commence précocement et se poursuit au fur et à mesure de la progression du front de lyophilisation. Il existe ensuite un palier au délà duquel la prolongation des opérations n'a plus d'effet. Nous n'avons pu déceler dans nos expériences une quelconque adsorption du virus lyophilisé sur le verre des ampoules ni une quelconque atteinte du virus par les radiations lumineuses au cours de la lyophilisation. Il est indéniable que plus le titre infectieux du virus est élevé avant lyophilisation mieux le poliovirus résiste. Comme un pH légèrement acide améliore les résultats, on aurait pu penser que la décomposition du bicarbonate et l'évaporation du CO_2 étaient responsables de la destruction du poliovirus ; le remplacement du bicarbonate par le tris (hydroxy méthyl) aminométhane, n'a pas permis de confirmer cette hypothèse.

L'accélération de la vitesse de lyophilisation par réduction du volume du produit, augmentation de la surface d'évaporation, ou injection d'azote n'améliore pas les résultats.

Des résultats peu significatifs ont été également obte par le ralentissement à basse température de la vitesse de lyophilisation.

En revanche, parmi plusieurs modes de reconstitution d produit lyophilisé, il est indéniable que la solution molai de chlorure de magnesium est plus favorable que l'eau disti

- La lyophilisation du poliovirus à la phase intracellulair de son développement pour tenter de lui constituer une enve artificielle et de lui permettre de mieux résister à la des cation n'a pas eu les effets escomptés ; après lyophilisati nous avons trouvé du poliovirus extracellulaire, et nous ne savons pas si la perméabilisation ou l'éclatement des membr cellulaires se sont produits au cours de la lyophilisation lors de la reconstitution du produit lyophilisé.
- La lyophilisation ne modifie pas le marqueur génétique thermique de Woff (rct) ; en particulier, les souches de poliovirus sauvage ou atténué gardent après lyophilisation leur caractère génétique.
- Une sélection de particules virales résistantes s'opère l de la lyophilisation ; en effet, après reconstitution d'une suspension de poliovirus lyophilisé suivi d'une deuxième lyophilisation, la baisse de titre infectieux est moindre de la deuxième opération que lors de la première. Cette sélection n'est cependant pas génétique car elle n'est pas transmissible après un seul passage en culture cellulaire.
La lyophilisation du poliovirus détruit l'acide ribonucléi que l'on ne peut mettre en évidence en présence de solution

hypertoniques. La capside du virus est également atteinte car le pouvoir antigénique mesuré chez le cobaye accuse une forte diminution après lyophilisation.

- Avec un stabilisateur à base de Vestolate à 5 % en solution tamponnée de Earle, la période de demi-vie à température ambiante pour le produit lyophilisé est de l'ordre de 11 jours. A + 4°C, la baisse du titre infectieux est de l'ordre de 1 logarithme en trois mois et de trois logarithmes en 18 mois.

- Des essais de lyophilisation en milieu non aqueux ont été menés. Le dioxanne est partiellement miscible à l'eau, ce qui simplifie les opérations alors qu'avec les solvants non miscibles à l'eau, il est nécessaire d'opérer préalablement un retrait de la phase aqueuse dans laquelle le poliovirus est en suspension. Ce nouveau procédé de lyophilisation ne nous a pas permis d'améliorer les résultats de la lyophilisation du poliovirus.

B I B L I O G R A P H I E.

1. Alexander H.E., Koch G, Mountain I.M. Sprunt C. Van Damme O. Infectivity of R.N.A. Of polio on Hela cells - Virology 1958, 5, I72-I73.

2. Alexander H.E., Koch G, Mountain I.M. Van Damme O. - Infectivity of R.N.A. from poliovirus in human cell monolayers - J. exp. Med. I959, 108, 493-505.

3. Allen E.G., Ben Kaneda, Girardi A.J, Mac Nair Scott T.F., Sigel M.M. Preservation of viruses of psittacosis, lymphogranuloma venereum group and herpes simplex under various conditions of storage - J. Bact. I952, 63, 369-376.

4. Annear D.I. Preservation of bacteria by drying in peptone plug. J. Hyg.(Camb.) 1956, 54, 487-508. J. Patho. Bact. I956, 72, 322.

5. Annear D.I., Beswick T.S.L. - A note on the preservation of influenza virus - J. Hyg. (Camb) 1956, 54, 509-511.

6. Annear D.I. - Recoveries of bacteria after drying on cellulose fibres - Austral. J. Exp. Biol. I962, 40, 1 - 8.

7. Annear D.I. - Preservation of Yeasts by drying. Austral. J. Exp. Biol. I963, 4I, 575-580.

8. Annear D.I. - Recoveries of bacteria after drying in glutamate and other substances Austral. J. Exp. Med. Sc. I964, 42, 7I7-722.

9. D'Arsonval M et Bordas F. De la distillation et de la dessication dans le vide à l'aide des basses températures. C.R. Ac. Sc. I906, I43, 567-570.

10. Ashwood Smith M.J. Preservation of Mouse bone marrow at - 79°C with DMSO. Nature 196I, 190, 1.204 [illegible]

11. Balayan M.S., Panosyan G.A. - Differential sensitivity of poliovirus strains to toluene - Acta virologica 1965, 9, 93

12. Baron.S. Ultracentrifuge concentration of poliovirus and effect of calf serum and gelatin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.I957, 95, 760-764.

13. Barski G, Cornefert F. Interference de la ribonucléase avec la multiplication du virus poliomyélitique en cultures cellulaires in vitro - Ann. Inst. Past. 1956, 91, 810-816.

14. Bauer.J.H. Pickels E.G.- Apparatus for freezing and drying virus in large quantities under uniform conditions. J. Exp. Med. 1940, 71, 83-88.

15. Beardmore W.B., Clark T.D., Jones K.V. - Preservation of Influenza virus infectivity by lyophilisation. Applied Microb. 1968, 16, 362-365.

16. Bovarnik M.R., Miller J. Snyder J.C. - The influence of certain salts, aminoacids, sugars and proteins on the stability of Rickettsiae - J. Bact. 1950, 59, 509.

17. Buckland F.E., Tyrrel D.A.J. loss of infectivity on drying various viruses - Nature 1962, 195, 1.063- 1.064.

18. Chatelain R. A propos de l'utilisation du glutamate de sodium dans la lyophilisation des bactéries - Ann. Inst. Past. 1963, 105, 111-116.

19. Cho C. Obayashi Y. Effect of adjuvant on preservability of dried B.C.G. vaccine at 37°C. Bull, C.M.S, 1956, 14, 657.

20. Collier L.H. Development of stable smallpox vaccine J. Hyg. (Camb.) 1955, 53, 76.

21. Collier L.H. Preservation of vaccinia virus - Bact. Rev. 1954, 18, 74-86.

22. Dousset M. - Lyophilisation en milieu non aqueux. Thèse Fac. Sc. Dijon 1964, n° 74.

23. Ellen R.A.O. Colter J.S. - Interaction of infectious R.N.A with mammalian cell line, relationship between osmotic pressure of the medium and production of infectious centers Virology 1960, 11, 434-443.

24. Fayet M.T. Conservation du virus aphteux congelé. Rev. Immunolog. 1964, 28, 277-284.

25. Fellowes O.N. - Comparison of cryobiological and freeze drying characteristics, of foot mouth disease virus and of vesicular stomatitis virus - Cryobiology 1968, 4, 223-231.

26. Fenje P. Stability of dried smallpox vaccine at various température - Symposium International sur la vaccination antivariolique Ed° Mérieux 1962, 139-147.

27. Flosdorf E.W. Mudd.S. Procedure and apparatus for preservation in lyophile form of serum and other biological substance. J. Immun. 1935, 29, 389-425.

28. Franklin R.M. - The significance of lipids in animal viruses Progress in Med. Virol. ed Karger et Melnick 1962, 4, 1-53.

29. Fry R.M., Greaves R.IN. - The Survival of bacteria during and after drying. J. Hyg. (Camb.) 1951, 49, 220-246.

30. Fry R.M. Freeze and drying of bacteria - Cryobiology ed. Meryman - 1966, 665-696.

31. George S, Gharpure P.V. - Lyophilisation of enteroviruses Indian J. Patho. Bact. 1964, 7, 46-53.

32. Goffe A.P., Laurence G.D., Vaccination against measles - Preparation and testing of vaccines consisting of living attenuated virus - Brit. Med. J. 1961, 2, 1244-1246.

33. Goffe A.P.- Poliomyelitis future prevention and control. Publ. Hlth. 1962, 76, 220-240.

34. Goret P. Application de la lyophilisation à la preparation des produits biologiques destinés à l'usage vétérinaire - Traité de lyophilisation ed. Herman et Rey 1960, 239-250.

35. Greaves R.I.N. La lyophilisation en Bactériologie. Traité de lyophilisation ed. Herman et Rey 1960, 207-218.

36. Greaves R.I.N. Recent advances in freeze drying. J. Pharmacy and Pharmacology 1962, 14, 621-639.

37. Greaves R.I.N. Fundamental aspects of freeze drying bacteria and living cells - Aspects theoriques et Industriels de la lyophilisation ed. Herman et Rey.1964, 407-410.

38. Greaves R.I.N., Davies J.D., - Separate effects of freezing thawing and drying living cells - Ann. N.Y.Ac.Sc.1965, 125, 548-558.

39. Greiff D, Blumenthal H. Effects on biological materials of freezing and drying by vacuum sublimation II effects on influenza virus. J. Exp. Med. 1954, 100, 89-101.

40. Greiff D. Myers M. Oxydative phosphorylation by suspensions of mitochondria following freeze drying - Biochim. Biophys. Acta.1963, 78, 45-51.

41. Greiff D, Rightsel W, Schuler E.E. Effects of freezing, storage and low température and drying by sublimation in vacuo on the activities of measle virus. Nature 1964, 202, 624-625.

42. Greiff D, Rightsel W. The effects on the activites of viruses of rates and temperature of freezing and thawing on drying by sublimation. Aspects théoriques et Industriels de la lyophilisation ed. Herman et Rey 1964, 369-406.

43. Greiff D., Rightsel W - An accelerated storage test for predicting the stability of suspensions of measle virus dried by sublimation in vacuo. J. Immunol. 1965, 94, 395-400.

44. Greiff D., Rigtsel W - Stabilities of suspensions of viruses after freezing or drying by vacuum sublimation and storage - Cryobiology 1967, 3, 432-444.

45. Holland J. Maclaren L.C. Syverton J.T. Mammalian cell virus relationship III Poliovirus production by non primate cells exposed to poliovirus R.N.A. Proc. Soc. Biol. Med.1959, 100, 843-845.

46. Holland.J., Mac Laren L.C., Syverton J.T. Infection of naturelly insusceptible cells with enterovirus R.N.A. J. Exp. Med. 1959, 110, 65-80.

47. Holland J. Hoyer. B.H. Mac Laren L.C., Syverton J.T. Enteroviral ribonucleic acid recovery from virus and assimilation by cells. J. Exp. Med. 1960, 112, 821-839.

48. Holland J., , Mac Laren L.C. Hoyer BH, Syverton J.T. - Enteroviral ribonucleic acid II Biological, physical and chemical studies - J. Exp. Med. 1960, 112, 841-864.

49. Holland J. Irréversible eclipse of poliovirus by Hela cells Virology 1962, 16, 163-176.

50. Ikegami N, Yoshikawa E, Tagaya I - Stabiliging effects of L. cystine on the thermal inactivation of poliovirus. Jap. J. Med. Sc. 1963, 16, 325-342, et 1964, 17, 13-22.

51. Johnson C.D., Goodpasture E.W. An investigation of the actiology of mumps - J. Exper. Med. 1934, 59, 1.

52. Koch.G, Koening S, Alexander H.E., Quantitative studies on the infectivity of R.N.A. from partially purified and highly purified poliovirus - Virology 1960- 10, 329-343.

53. Kraft L, Pollard M., Lyophilisation of poliomyelitis virus, Heat inactivation of dry MEFI virus - Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 1954, 86, 306-309.

54. Lamont P.H. Betts A.O. Enteroviruses of the pig. Nature 1958, 182, 608-9.

55. Landsteiner K, Levaditi C. La paralysie infantile expérimentale - C.R. Soc. Biol. 1909, 67, 787-789.

56. Le Bouvier G.L. Modification of poliovirus antigens by heat and UV - Lancet 1955, 269, 1.014-1.016.

57. Lépine P. Lyophilisation des virus vaccins en médecine humaine - Traité de lyophilisation. Ed. Flammarion Rey 1960, 227-238.

58. Levintow L. Darnell.J.E. A simplified procedure for purification of large amounts of poliovirus. J. Biol. Chemistry. 1960, 235, 70-73.

59. Lovelock J.E. The denaturation of lipid protein complexes as a cause of damage by freezing - Proc. Roy Soc. London, ser. B. 1957, 147, 427.

60. Lund E. Effect of pH on oxidative inactivation of poliovirus Arch. Ges. Virusforsch 1963, 12, 637-647.

61. Luyet B.J. Phase transitions encountered in the rapid freezing of aqueous solutions - Ann. N.Y. Ac. Sc. 1965, 125, 502-521.

62. Lwoff A, Lwoff M - Remarques sur quelques caractères du développement du virus de la poliomyélite. C.R. Ac. Sc. (Paris) 1959, 248, 1·725 - 1.727.

63. Lwoff A, Horne W, Tournier P. Un système des virus - C.R. Ac. Sc (Paris) 1962, 254, 4.225.

64. Melnick J.L., Wallis C. Effect of pH on thermal stabilization of oral poliovirus vaccine by Cl2 Mg - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. I963, 112, 894-897.

65. Merryman H.T. Drying of living mamamelian cells. Ann N.Y. Ac. Sc. I960, 85, 729.

66. Merryman H.T. Review of Biological freezing in Cryobiology ed Meryman, Academic Press 1966, 609-663.

67. Moore D, Helprin J.J, Hiatt C.W, Classification of viruses by photodynamic inactivation Bact. Proc. I962, I50.

68. Nagel J, Hekker A.C., Hofman B, Cohen H. Some experiments on freeze drying of inactivated poliovaccine - Arch. ges. Virusforch 1963, 12, 7I6-720.

69. Nefedieva N.P. Petrushina L.I., Bakina MN, Parish B.M, Mironov VA. Lyophilisation of type specific staphylococcus bacteriophage. J. Mikrobio. Immunol. (Moscou) 1965, 4, 12I-I24.

70. Netter R. Preparation du virus vaccin bovipestique lapinise lyophilisé - Bull. Off. Intern. Epizootie 1959, 5I, 704-9.

7I. Obayashi Y, Ota S, Araï S.- Some factors affecting preservability of freeze dried bacteria - J. Hyg (Camb) 196I, 59, 77-9I.

72. Olitsky P.K, Casals J, Walker D.L., Ginsberg H.S.,Horsfall F.L., Preservatinn of viruses in a mechanical refrigerator at -25°C. J. Lab. Clin. Med. I949, 34, I.023.

73. Olitsky P.K, Yoger R.H. Murphy L.C. - Preservation of neurotropic viruses - U.S. Armed Forces M.J. I950, I,4I5.

74. Orfila J. Lyophilisation du virus ECHO 9. C.R. Soc. Biol. I958, I52, 500-50I.

75. Panthier R. Homogeneité qualité essentielle de toute suspension virulente - Ann. Inst. Past. I957, 92, 3I0-32I.

76. Panthier R. Presentation d'appareil utilisé pour la préparation du vaccin antiamaril. Bull. Soc. Path. Exop. I956, 49, 6I6-6I9.

77. Peloux Y - Nofre C. Cier A. Colobert L. Inactivation du virus poliomyélitique par des systèmes chimiques générateurs du radical libre hydroxyle. Ann. Inst. Past. I962, I02, 6-23.

78. Pohjanpelto P. Stabilization of poliovirus by cystine - Virology 1958, 6, 472-487.

79. Pohjanpelto P. - Response of enterovirus to cystine - Virology 196I, 15, 225-230 et 23I-236.

80. Pohjanpelto P. Stabilizing effect of cystine on antigenicity of poliovirus - Ann. Med. Exp. Fenn. I962, 40, I03-I07.

8I. Pollard M. The inactivation of poliomyelitis virus by freeze drying - Texas rep. Biol. Med. I95I, 9, 749-755.

82. Polson A, Hampton J.W.F. Studies on poliomyelitis virus concentration and purification J. Hyg. (Camb.) I957, 55, 344-346.

83. Porterfield.J.S. Ashwood Smith M.J. Preservation of cells in tissue culture by glycerol and DMSO. Nature I962, I93, 548-550.

84. Prinzie A.- Le Poliovirus, Etude des propriétés antigéniques et infectieuses Ed. Nauwelaerts Louvain I962.

85. Quevillon M., Benoît J.C., Panisset M - Etude quantitative de la viabilité des bactéries avant et après lyophilisation. Rev. Can. Biol. I963, 22, 447-457.

86. Rafyi A. Kaweth M, Ramier H. La conservation du virus de la peste bovine par lyophilisation. Ann. Inst. Past.I955, 88, 793-794.

87. Rey.L. et Col. Traité de lyophilisation Ed. Herman I960.

88. Rey L. et Col. Progrès récents en lyophilisation ed Herman 1962.

89. Rey L. et Col. Aspects Industriels de la lyophilisation et Herman I964.

90. Rightsel W, Greiff D. Freeze and freeze drying of viruses Cryobiology 1967, 3, 423-43I.

9I. Ritova V.V. Estigneeva N.A. Vaccin vivant de culture cellulaire contre l'influenza. Bull. OMS I962, 27, 729-734.

92. Rouandeh H. Comparison of methods for plaque assay of picornavirus RNA. Virology 1965, 27, 439-44I.

93. Sawyer W.A. Lloyd W.D, Kitchen S.F., The preservation of yellow fever virus - J. exp. Med. I929, 50, 1.

94. Scherp H.W., Flosdorf.E.W., Shaw D.R. - Survival of the influenza virus under various conditions - J. Immunol. 1938, 34, 447.

95. Schmidt U, Veckenstedt A. Haltbarkeitsdauer attenuirter Maul und Klauenseuch - Virusstamme nach lyophilisation - Arch. für Exp. Veterinär 1964, 18, 1169-1182.

96. Shackell. L.F. An. impove method of dessication with some applications to biological problems. Amer.J. Physiol.I909, 24, 325.

97. Speck R.S., Jawetz E, Coleman V.R. Stability and preservation of egg adapted herpes simplex. J. Bact. I95I, 6I, 253.

98. Sprecher - Goldberger S. The effect of ionic strenght and slow cooling on thermolability of infectious R.N.A. Arch. ges. Virusforch I964, 14, 268-27I.

99. Sprunt K, Koenig S, Alexander H.E.,Factors influencing the degree of infectivity of enterovirus R.N.A. II Role of host cell RNA inactivators, in the low degree of infectivity of poliovirus RNA in low salt concentration. Virology 196I, I3, I35-I36.

100. Tyrrel DAJ. Ridgwell. B. Breeze drying of certain viruses Nature I965, 206, 115-II6.

IOI. Veeraraghavan N. Preparation of lyophilized rabies street virus material from infective submaxillary glands for challenge purpose - Bull. OMS I957, 17, 937-942 et Rapport technique OMS n° I2I, I957, Annexe 3, 29-30.

102. Veeraraghavan N, Subrahmanyan T.P. Antigenic value of lyophilized phenolized antirabic vaccine - Bull. OMS.1961 25, 115-117.

103. Verge J. Goret P, Mérieux C. Nouvelle note sur la conservation de quelques virus par la dessication. Ann. Past. 1946, 72, 499.

104. Vieu J.F., Diverneau G. Lyophilisation du bacteriophage C.R. AC. Sc (Paris) 1962, 254, 3.149-3.151.

105. Vieu J.F., Nicolle P, Diverneau G. Lyophilisation du lysotype A de S. Typhi. Influence de la concentration bactérienne C.R. Ac. Sc. (Paris) 1963, 257, 2.555.

106. Wallis C, Melnick J.L. Cationic stabilization ; new property of enteroviruses - Virology 1962, 16, 504-505.

107. Wallis C, Melnick J.L. Thermal, inactivation of poliovirus under anaérobic conditions - J. Bact. 1962, 84, 389-392.

108. Wallis C, Melnick JL. Magnesium chloride enhancement of cell susceptibility to poliovirus - Virology 1962, 16, 122-132.

109. Wallis C, Smith K.O, Melnick J.L., Reovirus activation by-heating and inactivation by cooling - 75°C in Mg Cl2 solution - Virology 1964 - 22, 608-619.

110. Wallis C, Melnick J.L. Stabilization of enveloped viruses by DMSO - J. Virol. 1968, 2, 953-954.

111. Wecker E, Hummeler K, Goetz O - Relationship between viral RNA and viral Protein synthesis. Virology 1962, 17, 110-111.

112. Wooley J.G. the preservation of CML and St. Louis encephalitis virus by freezing and drying in vacuo. Publ. Hlth. Rep. 1939, 54, 1.077-1.079.

113. Wurtz MR. et Camus L. Le vaccin sec. Technique de sa préparation. Bull. Ac. Nat. Med. 1919, 82, 12.

TABLE DES MATIERES

	pages
Introduction	1
Chapitre I. Matériel et technique	10
Chapitre II. Influence du milieu stabilisateur sur la survivance du poliovirus après lyophilisation	
a) support cellulaire	17
b) milieux stabilisateurs	18
Chapitre III. Influence de quelques facteurs physiques sur la survivance du poliovirus après lyophilisation	
a) congélation	42
b) évolution du titre en cours de lyophilisation	44
c) adsorption par le verre	45
d) atteinte possible par les radiations lumineuses	46
e) la concentration de virus	47
f) le pH	48
g) le degré de dessication	49
h) la vitesse de lyophilisation	51
i) la reconstitution de la suspension virale après lyophilisation	60
j) Etat du virus	65
Chapitre IV. Etude du maintien des caractères génétiques et de l'antigénicité du virus lyophilisé	75
1) Marqueur génétique (rct)	
2) Sélection de particules résistantes à la dessication	77
3) Pouvoir antigène	77
Chapitre V. Conservation dans le temps du virus lyophilisé	83
Chapitre VI. Essais de lyophilisation du poliovirus en milieu non aqueux	89
Résultats Diethylamine	93
" Dioxanne	94
" Benzène	109
Résultats Chloroforme	111
Tétrachlorure de carbone	112
Courbe d'analyse thermique	114
CONCLUSIONS	116
Bibliographie	120
Table des Matières	129

DEUXIEME THESE.

Propositions données par la Faculté.

VIRUS ET ALIMENTATION.
HUMAINE.

Vu et Approuvé,

Dijon, le
Le Doyen,

Vu et permis d'imprimer,

Dijon, le
Le Recteur de l'Académie,